

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 105**

51 Int. Cl.:

**C12M 3/00** (2006.01)

**C12M 3/02** (2006.01)

**C12N 15/89** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.10.2012 PCT/US2012/060646**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.04.2013 WO13059343**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2012 E 12841329 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 2768942**

54 Título: **Administración intracelular**

30 Prioridad:

**17.10.2011 US 201161548013 P**

**17.08.2012 US 201261684301 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**02.06.2020**

73 Titular/es:

**MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY  
(100.0%)**

**77 Massachusetts Avenue  
Cambridge, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

**SHAREI, ARMON;  
ADAMO, ANDREA;  
LANGER, ROBERT y  
JENSEN, KLAVS, F.**

74 Agente/Representante:

**MARTÍN BADAJOZ, Irene**

**ES 2 764 105 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Administración intracelular

5 **Solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional estadounidense n.º 61/548.013, presentada el 17 de octubre de 2011, y la solicitud provisional estadounidense n.º 61/684.301, presentada el 17 de agosto de 2012.

10 **Declaración en cuanto a investigación con financiación federal**

Esta invención se realizó al menos en parte con apoyo del gobierno de acuerdo con la subvención 5 RC1 EB011187-02, concedida por el Instituto Nacional de la Salud. El gobierno tiene determinados derechos en esta invención.

15 **Antecedentes**

Muchas empresas farmacéuticas se centran en gran medida en el desarrollo de fármacos de molécula pequeña. Estos fármacos se denominan así debido a su tamaño relativamente pequeño que les permite difundirse libremente a través de todo el organismo para alcanzar su diana. Estas moléculas también son capaces de deslizarse, en gran parte sin dificultades, a través de la membrana celular por lo demás impermeable. Sin embargo, la nueva generación de terapias basadas en proteínas, ADN o ARN, no pueden atravesar fácilmente la membrana celular y por tanto requieren modificación celular para facilitar la administración. Métodos establecidos usan productos químicos o pulsos eléctricos para romper la membrana y administrar el material en el citoplasma. La administración intracelular apropiada es una etapa crítica en la investigación, el desarrollo y la implementación de la nueva generación de productos terapéuticos.

Los métodos existentes son con frecuencia difíciles de desarrollar y altamente específicos para su aplicación particular. Además, muchos tipos de células clínicamente importantes, tales como células madre y células inmunitarias, no se abordan de manera apropiada por los métodos existentes. Por tanto, existe una necesidad de una técnica más robusta y precisa capaz de abordar las necesidades de la investigación biológica/médica moderna.

Como ejemplo de los métodos ya conocidos y sistemas respectivos, el documento US 2009/280518 A1 describe un sistema para medir una propiedad mecánica de una célula, en el que se mide una elasticidad de la célula observando cómo reacciona una célula frente a la compresión y deformación usando sensores, y, en más detalle, en el que en primer lugar se mide una resistividad eléctrica de la célula mediante un par de electrodos, se hace pasar a través de una característica de deformación de célula, y después se mide de nuevo la resistividad eléctrica de la célula mediante un segundo par de electrodos. Como ejemplo adicional, el artículo "Shear-Induced Intracellular Loading of Cells With Molecules by Controlled Microfluidics" de Daniel M. Hallow *et al.*, BIOTECHNOLOGY and BIOENGINEERING, WILEY & SONS, HOBOKEN, NJ, EE.UU., 2008, 99 (4), págs. 846-854, describe un estudio para someter a prueba la hipótesis de que un flujo controlado a través de microcanales puede provocar la carga intracelular inducida por cizalladura de células con moléculas, en el que, en particular, se expusieron células de cáncer de próstata DU145 a tensión de cizalladura de fluido en presencia de moléculas que penetran en células fluorescentes usando un dispositivo de cizalladura de cono y placa o flujo a alta velocidad a través de microcanal, en el que, usando una bomba de jeringa, se hicieron fluir suspensiones celulares a través de microcanales con un diámetro de 50-300 micrómetros. Sin embargo, todavía existe la necesidad de una técnica más robusta y precisa capaz de abordar las necesidades de la investigación biológica/médica moderna.

50 **Sumario**

La invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que una lesión controlada, por ejemplo, sometiendo una célula a un estrechamiento, un estiramiento rápido, una compresión rápida o un pulso de alta tasa de cizalladura, conduce a la captación de moléculas en el interior del citoplasma celular a partir del medio celular circundante. El objetivo de la presente invención se logra con un sistema microfluídico para provocar perturbaciones en una membrana celular de una célula para administrar una carga útil de manera intracelular según la reivindicación 1, un método para administrar una carga útil en una célula según una cualquiera de las reivindicaciones 10, 20 ó 26, y un sistema microfluídico para su uso con una célula suspendida en una disolución y para provocar perturbaciones en una membrana de la célula según la reivindicación 30. Por tanto, la invención presenta una plataforma microfluídica libre de vectores para la administración intracelular directa al citosol de materiales, por ejemplo, un compuesto o una composición, a una célula eucariota. El dispositivo es útil como herramienta de laboratorio versátil y ampliamente aplicable para administrar moléculas deseadas en células diana. La administración de moléculas en la célula usando los métodos descritos en el presente documento es proporcional, por ejemplo, linealmente o de manera monotónica, a la velocidad de célula a través de un estrechamiento y/o la presión. Por ejemplo, 50 µl de suspensión celular pasan a través del dispositivo en unos pocos segundos. El rendimiento oscila entre 1 célula/segundo por canal (o incluso menos) y más de 1.000 células/segundo por canal. Las velocidades de célula típicas a través del estrechamiento incluyen de 10 mm/segundo a 500 mm/segundo, aunque las velocidades de célula pueden ser de hasta 10 m/s (o

incluso superiores). Pueden colocarse canales adicionales en paralelo para aumentar el rendimiento global del sistema.

La captación de molécula se basa en difusión en vez de endocitosis, es decir, la carga útil (compuesto(s) que va(n) a administrarse a la célula) está presente en el citoplasma en vez de en endosomas tras el paso a través del dispositivo. Poca o ninguna carga útil aparece en endosomas tras el tratamiento celular. Por ejemplo, las moléculas grandes se captan más lentamente que las moléculas más pequeñas. El estiramiento celular controlado y la velocidad de movimiento de las células a través del estrechamiento conducen a una administración superior de moléculas diana al tiempo que se conserva la viabilidad e integridad de las células. Tras el tratamiento, la viabilidad celular es de entre el 70-100%, por ejemplo, la viabilidad típica es del 90% tras el tratamiento. En comparación, se ha mostrado que métodos de administración previos que usan altas tasas de cizalladura solas durante segundos o milisegundos conducen a una escasa viabilidad de células tras el tratamiento. A diferencia de técnicas anteriores, los métodos de la invención someten las células a un pulso de cizalladura que oscila desde 100-1000 Pa durante un periodo de tiempo muy corto (aproximadamente 100 microsegundos) a medida que la célula pasa a través del estrechamiento. Sin embargo, las presentes técnicas son fundamentalmente diferentes de técnicas anteriores. En las presentes técnicas, hay preferiblemente una deformación mecánica completa de la célula a medida que pasa a través del estrechamiento, que puede imponer fuerzas de cizalladura diferentes de las técnicas anteriores. En realizaciones preferidas, las células no se someten a una corriente eléctrica. En otras realizaciones, se usa un tratamiento de combinación, por ejemplo, deformación mecánica usando el dispositivo descrito en el presente documento seguida por, o precedida por, electroporación (un tipo de transfección osmótica en la que se usa una corriente eléctrica para producir orificios temporales en membranas celulares, permitiendo la entrada de ácidos nucleicos o macromoléculas).

Una carga útil es un compuesto o una composición que va a administrarse en una célula. Por ejemplo, una carga útil puede incluir proteínas, colorantes fluorescentes, puntos cuánticos, nanotubos de carbono, moléculas de ARN, moléculas de ADN, antígenos y otras macromoléculas, nanopartículas y composiciones de materia.

La anchura del estrechamiento del dispositivo, la longitud de la porción estrechada, la geometría de la región de entrada y la profundidad de canal del dispositivo influyen sobre la administración de moléculas en la célula. Preferiblemente, la anchura de la porción estrechada del conducto es de no menos de 4  $\mu\text{m}$  de diámetro, y la longitud de la porción estrechada del conducto es preferiblemente de entre 40-50  $\mu\text{m}$ . Generalmente, la longitud de la porción estrechada no supera 90  $\mu\text{m}$ . El diámetro de la porción estrechada está relacionado con el tipo de célula que va a tratarse. Tal como se describe a continuación, el diámetro es menor que el diámetro de la célula (por ejemplo, el 20-99% del diámetro de la célula). Muchas células tienen entre 5-15  $\mu\text{m}$  de diámetro, por ejemplo las células dendríticas tienen 7-8  $\mu\text{m}$  de diámetro. Por ejemplo, el diámetro de la porción de estrechamiento es de 4,5, 5, 5,5, 6 ó 6,5  $\mu\text{m}$  para el procesamiento de células individuales. En otro ejemplo, el tamaño/diámetro de la porción estrechada para el procesamiento de un óvulo humano es de entre 6,2  $\mu\text{m}$  y 8,4  $\mu\text{m}$ , aunque son posibles estrechamientos más grandes y más pequeños (el diámetro de un óvulo humano es de aproximadamente 12  $\mu\text{m}$ ). En aún otro ejemplo, se procesan embriones (por ejemplo, agrupaciones de 2-3 células) usando un diámetro de estrechamiento de entre 12  $\mu\text{m}$  y 17  $\mu\text{m}$ .

El dispositivo y los métodos son útiles en el desarrollo y la producción de vacunas usando células presentadoras de antígeno profesionales tales como células dendríticas. Por ejemplo, se lleva a cabo un método de estimulación de presentación de antígeno sometiendo una célula dendrítica a una lesión controlada tal como estrechamiento transitorio o pulso de alta cizalladura y poniendo en contacto la célula dendrítica con una disolución que comprende un antígeno diana. El método proporciona células presentadoras de antígeno altamente activadas en comparación con métodos de estimulación anteriores. La producción de vacunas se lleva a cabo propulsando células dendríticas u otras células presentadoras de antígeno a través del dispositivo que contiene estrechamiento (sometiendo así a las células a un acontecimiento de estiramiento rápido) y después incubando las células en una disolución que contiene la carga útil, por ejemplo, antígeno. Se bañan las células en un medio de cultivo celular que contiene uno o más antígenos tras la deformación rápida de las células, pero las células pueden ponerse en contacto con el antígeno antes, durante y/o después del acontecimiento/procedimiento de deformación rápida.

Opcionalmente se usan tensioactivos (por ejemplo, al 0,1 - 10% p/p) (por ejemplo, poloxámero, suero de origen animal, proteína albúmina) en el tampón de flujo. La administración de moléculas en células no se ve afectada por la presencia de tensioactivos; sin embargo, opcionalmente se usan tensioactivos para reducir la obstrucción del dispositivo durante el funcionamiento.

El dispositivo se fabrica de silicio, metal (por ejemplo, acero inoxidable), plástico (por ejemplo, poliestireno), cerámicas o cualquier otro material adecuado para grabar químicamente características a escala micrométrica e incluye uno o más canales o conductos a través de los cuales pasan células. El silicio es particularmente muy adecuado, porque hay métodos de formación de micropatrones bien establecidos con este material, por tanto es más fácil fabricar nuevos dispositivos, cambiar diseños, etc. Adicionalmente, la rigidez del silicio puede proporcionar ventajas con respecto a sustratos más flexibles tales como polidimetilsiloxano (PDMS), por ejemplo, tasas de administración superiores. Por ejemplo, el dispositivo incluye 2, 10, 20, 25, 45, 50 75, 100 o más canales. El

dispositivo se produce por microfabricación grabando químicamente el silicio. Las células se mueven, por ejemplo, se empujan, a través de los canales o conductos mediante aplicación de presión. Un impulsor de células puede aplicar la presión. Un impulsor de células puede incluir, por ejemplo, una bomba de presión, un cilindro de gas, un compresor, una bomba de vacío, una jeringa, una bomba de jeringa, una bomba peristáltica, una jeringa manual, una pipeta, un pistón, un accionador capilar y la gravedad. Como alternativa a los canales, las células pueden hacerse pasar a través de un estrechamiento en forma de una red o placas colocadas cerca. En cualquier caso, la anchura del estrechamiento a través del cual atraviesan las células es del 20-99% de la anchura o el diámetro de la célula que va a tratarse en su estado natural, es decir, sin someter a tensión. La temperatura puede afectar a la captación de composiciones y afectar a la viabilidad. Los métodos se llevan a cabo a temperatura ambiente (por ejemplo, 20°C), temperatura fisiológica (por ejemplo, 39°C), temperatura superior a la fisiológica o temperatura reducida (por ejemplo, 4°C), o temperaturas entre estas temperaturas a modo de ejemplo.

Tras la lesión controlada de la célula mediante estrechamiento, estiramiento y/o un pulso de alta tasa de cizalladura, se incuban las células en una disolución de administración que contiene el compuesto o la molécula que se desea introducir en la célula. La lesión controlada puede caracterizarse como un defecto pequeño, por ejemplo, de 200 nm de diámetro, en la membrana celular. El periodo de recuperación para las células es del orden de unos pocos minutos para cerrar la lesión provocada pasando a través del estrechamiento. El periodo de administración comprende 1-10 minutos o más, por ejemplo, 15, 20, 30, 60 minutos o más, siendo 2-5 minutos óptimo cuando se trabaja a temperatura ambiente. Periodos de tiempo de incubación más prolongados en la disolución de administración no proporcionan necesariamente una captación aumentada. Por ejemplo, los datos indicaron que tras 5 minutos, se capta poco o nada de material adicional por las células.

Por tanto, la invención proporciona una solución a problemas que han durado mucho tiempo en el campo de la administración de fármacos a células y a inconvenientes asociados con métodos anteriores.

Con respecto a la administración de material a una célula eucariota, las células pueden clasificarse en dos categorías principales:

1) Células de administración fácil (ETD): la mayoría de los métodos virales y químicos disponibles se encuentran en esta categoría. Con frecuencia las células de administración fácil no tienen ninguna relevancia clínica directa.

2) Células de administración difícil (DTD): alta relevancia clínica. Los avances en la tecnología de administración pueden permitir/acelerar en gran medida el desarrollo de nuevas terapias. Esta categoría incluye células madre, células primarias y células inmunitarias. Se espera que el mercado para la administración de DTD crezca drásticamente a medida que nuevos productos terapéuticos basados en ARN, células madres y proteínas ganen impulso en los próximos años.

Las técnicas descritas en el presente documento han demostrado ser especialmente útiles para las áreas de investigación de DTD, aunque las mismas técnicas pueden usarse con células ETD. Además, se ha facilitado la administración de materiales (tales como puntos cuánticos, nanotubos de carbono y anticuerpos) que no pueden administrarse eficazmente mediante ningún otro método a células ni ETD ni DTD.

En general, en un aspecto, la presente invención proporciona un sistema microfluídico que tiene las características según la reivindicación 1 o la reivindicación 30.

Implementaciones de la invención también pueden proporcionar una o más de las siguientes características. Una sección transversal del canal se selecciona del grupo que consiste en circular, elíptica, una hendidura alargada, cuadrada, hexagonal y triangular. El estrechamiento incluye una porción de entrada, un punto central y una porción de salida. La porción de entrada define un ángulo de estrechamiento, en el que el ángulo de estrechamiento está optimizado para reducir la obstrucción del canal. El sistema microfluídico incluye además una pluralidad de los canales microfluídicos dispuestos en paralelo, por ejemplo, 2, 5, 10, 20, 40, 45, 50, 75, 100, 500, 1.000 o más.

En general, en otro aspecto, la presente invención también proporciona un método que tiene las características según la reivindicación 10.

Implementaciones de la invención también pueden proporcionar una o más de las siguientes características. Una sección transversal del canal microfluídico se selecciona del grupo que consiste en circular, elíptica, una hendidura alargada, cuadrada, hexagonal y triangular. Hacer pasar la disolución incluye hacer pasar la disolución a través de una porción de entrada, un punto central y una porción de salida del estrechamiento. El método puede incluir además reducir la obstrucción del canal microfluídico ajustando un ángulo de estrechamiento de la porción de entrada. La solución incluye hacer pasar la disolución a través de una pluralidad de canales microfluídicos dispuestos en paralelo.

En general, en todavía otro aspecto, la presente invención también proporciona un método que tiene las características según la reivindicación 20.

Implementaciones de la invención también pueden proporcionar una o más de las siguientes características. Una sección transversal del canal microfluídico se selecciona del grupo que consiste en circular, elíptica, una hendidura alargada, cuadrada, hexagonal y triangular. Hacer pasar la disolución incluye hacer pasar la disolución a través de una porción de entrada, un punto central y una porción de salida del estrechamiento. El método incluye además reducir la obstrucción del canal microfluídico ajustando un ángulo de estrechamiento de la porción de entrada. Hacer pasar la disolución incluye hacer pasar la disolución a través de una pluralidad de canales microfluídicos dispuestos en uno de en serie y en paralelo. Incubar incluye incubar la célula durante de 0,0001 segundos a 20 minutos (o incluso más). La presión es una de cizalladura y compresión.

En general, en aún otro aspecto, la presente invención también proporciona un método que tiene las características según la reivindicación 26.

Implementaciones de la invención también pueden proporcionar una o más de las siguientes características. Deformar la célula incluye deformar la célula durante de 1  $\mu$ s a 10 ms, por ejemplo, 10  $\mu$ s, 50  $\mu$ s, 100  $\mu$ s, 500  $\mu$ s y 750  $\mu$ s. La incubación se produce durante de 0,0001 segundos a 20 minutos, por ejemplo, 1 segundo, 30 segundos, 90 segundos, 270 segundos y 900 segundos.

Diversas implementaciones de la invención pueden proporcionar una o más de las siguientes capacidades. Puede lograrse una mayor precisión y capacidad de ajuste a escala de la administración en comparación con técnicas anteriores. La administración de un material a una célula puede automatizarse. Puede implantarse material tal como proteínas, ARN, ARNip, péptidos, ADN y colorante impermeable en el interior de una célula, tal como células madre embrionarias o células madre pluripotentes inducidas (iPSC), células primarias o líneas celulares inmortalizadas. El dispositivo y los métodos pueden aplicarse a cualquier tipo de célula, y el tamaño de la porción estrechada se ajusta a medida para la célula que va a tratarse. Los dispositivos y métodos pueden proporcionar ventajas significativas. Por ejemplo, puede reducirse el ruido experimental en sistemas actuales en comparación con técnicas anteriores. Las cantidades de administración de un material pueden ser sistemáticas a lo largo de la población celular. Pueden manipularse células individualmente en vez de manipularse en lote. La invención también ha demostrado una oportunidad bastante única de administrar una variedad de nanopartículas y proteínas al citosol. Los métodos existentes son bastante poco fiables o ineficaces en la realización de tales funciones.

Con respecto a la administración de cargas útiles sensibles, por ejemplo, se administran de manera fiable proteínas (especialmente proteínas grandes, por ejemplo, de más de 30, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500 kDa o más), puntos cuánticos u otras cargas útiles que son sensibles a, o se ven dañadas por, exposición a electricidad, en células al tiempo que se conserva la integridad y actividad de la carga útil sensible. Por tanto, el dispositivo y los métodos tienen ventajas significativas con respecto a técnicas existentes tales como electroporación, que somete composiciones de carga útil a electricidad (dañando de ese modo la carga útil) y conduce a una baja viabilidad celular (por ejemplo, 505 o más de las células mueren normalmente tras la electroporación). Otra ventaja del método de estiramiento/deformación rápido es que las células madre o precursoras se vuelven receptivas a la captación de carga útil sin alterar el estado de diferenciación o la actividad de la célula tratada. Además de la administración de composiciones en el citoplasma celular con propósitos terapéuticos, por ejemplo, la producción de vacunas, el método se usa para introducir moléculas, por ejemplo, moléculas grandes que comprenden un marcador detectable, para marcar estructuras intracelulares tales como orgánulos o para marcar constituyentes intracelulares con propósitos de diagnóstico u obtención de imágenes.

Diversas implementaciones de la invención también pueden proporcionar una o más de las siguientes capacidades. Puede administrarse ADN en células de dosis para administrar tales como células madre, primarias, inmunitarias. Puede lograrse la administración de plásmidos muy grandes (incluso cromosomas enteros). También puede lograrse fácilmente la administración cuantitativa en células de una cantidad conocida de un constructo génico para estudiar el nivel de expresión de un gen de interés y su sensibilidad a la concentración. Puede lograrse la administración de cantidades conocidas de secuencias de ADN junto con una cantidad conocida de enzimas que potencian la recombinación de ADN con el fin de lograr una administración, una recombinación homóloga y una mutagénesis dirigida al sitio estables más fáciles/eficientes. Los métodos y dispositivos descritos en el presente documento también pueden ser útiles para la administración cuantitativa de ARN para estudios de ARN más eficientes/concluyentes. También se logra fácilmente la administración de ARN de interferencia pequeño (ARNip) en el citoplasma de una célula.

Diversas implementaciones de la invención también pueden proporcionar una o más de las siguientes capacidades. Puede administrarse ARN en una célula para el silenciamiento de ARN sin necesidad de liposomas. Pueden administrarse cantidades conocidas de moléculas de ARN junto con cantidades conocidas de moléculas Dicer para lograr ARN normalizado, eficiente, a lo largo de múltiples líneas celulares en diferentes condiciones. También puede administrarse ARNm en células para estudiar aspectos de regulaciones de la expresión génica a nivel posttranscripcional. Pueden ser posibles cantidades conocidas de marcador de ARN para estudiar la semivida de ARN y células. Puede lograrse una administración de proteína universal. Pueden administrarse cantidades conocidas de proteínas marcadoras para estudiar su semivida en células. Puede lograrse la administración de proteínas marcadoras para estudiar la ubicación de proteínas. Pueden administrarse cantidades conocidas de proteínas etiquetadas para estudiar interacciones proteína-proteína en el entorno celular. Puede lograrse la

administración de anticuerpos marcados en células vivas para inmunotinción e inmunotransferencia de tipo Western basada en fluorescencia.

Diversas implementaciones de la invención también pueden proporcionar una o más de las siguientes capacidades clínicas y de investigación. Puede lograrse la administración cuantitativa de fármacos a modelos celulares para estudios de examen y dosificación mejorados. El método puede desplegarse como un método de alto rendimiento de examen de actividad de proteínas en el citosol para ayudar a identificar productos terapéuticos de proteínas o entender mecanismos de enfermedad. Tales aplicaciones se encuentran en la actualidad gravemente limitadas por los métodos de administración de proteínas actuales debido a sus ineficacias. Los dispositivos y las técnicas son útiles para la administración intracelular de fármacos a un subconjunto específico de células sanguíneas circulantes (por ejemplo, linfocitos), administración de alto rendimiento de azúcares en células para mejorar la crioconservación de células, especialmente ovocitos, diferenciación celular dirigida mediante introducción de proteínas, ARNm, ADN y/o factores de crecimiento, administración de material genético o proteico para inducir reprogramación celular para producir células iPS, administración de ADN y/o enzimas de recombinación en células madre embrionarias para el desarrollo de líneas de células madre transgénicas, administración de ADN y/o enzimas de recombinación en cigotos para el desarrollo de organismos transgénicos, activación de células DC, generación de iPSC y diferenciación de células madre, administración de nanopartículas para diagnóstico y/o estudios mecanísticos así como introducción de puntos cuánticos. También se modifican células de la piel usadas en relación con cirugía plástica usando los dispositivos y el método descritos en el presente documento.

Un método de estimulación de la presentación de antígenos usando el método para administrar moléculas de antígeno y/o estimulantes del sistema inmunitario proporciona células presentadoras de antígeno, por ejemplo, células dendríticas, con niveles mejorados de actividad en comparación con métodos convencionales de estimulación, conduciendo así a niveles aumentados de inmunidad mediada por células T y B frente a un antígeno diana. Por tanto, un método de este tipo puede emplearse como medio de activación del sistema inmunitario en respuesta a cáncer o infecciones.

Para fines de examen, obtención de imágenes y diagnóstico, el dispositivo puede usarse en un método de marcaje de células. Un método de marcaje de una célula se lleva a cabo sometiendo una célula a una lesión controlada y poniendo en contacto la célula con una disolución que comprende un marcador detectable, en el que dicha lesión comprende un pulso de alta cizalladura o estrechamiento transitorio. El marcador detectable comprende una molécula fluorescente, un radionúclido, puntos cuánticos, nanopartículas de oro o perlas magnéticas.

Antes de la invención, la manipulación de células madre con el propósito de introducir composiciones exógenas ha sido difícil. El dispositivo y los métodos descritos en el presente documento, por ejemplo, el paso de células madre o células progenitoras tales como células madre pluripotentes inducidas (iPSC) a través de un canal de estrechamiento no induce diferenciación, pero sí induce de manera fiable la captación de composiciones en la célula. Por ejemplo, se introducen factores de diferenciación en tales células. Tras la captación de factores introducidos, las células proceden en una ruta de diferenciación dictada por el factor introducido sin complicaciones asociadas con el método mediante el cual se introdujo/introdujeron el/los factor(es) en la célula.

Además de células individuales, se tratan incluso células muy grandes, por ejemplo, óvulos; de aproximadamente 200  $\mu\text{m}$  de diámetro, agrupaciones de células, por ejemplo, agrupaciones de 2-5 células tales como un embrión que comprende 2-3 células, para captar composiciones diana. El tamaño de la abertura se ajusta en consecuencia, es decir, de tal manera que la anchura del estrechamiento está justo por debajo del tamaño de la agrupación. Por ejemplo, la anchura del canal es del 20-99% de la anchura de la agrupación de células.

Se purifican/aíslan células o agrupaciones de células o se enriquecen para el tipo de célula deseado. Se purifican o enriquecen células dendríticas u otras células, por ejemplo, células inmunitarias tales como macrófagos, células B, células T, o células madre tales como células madre embrionarias o iPSC, usadas en los métodos. Por ejemplo, se aíslan o se enriquecen células gracias a la expresión de sus marcadores de superficie celular u otras características identificativas. Se identifican y aíslan células dendríticas gracias a su expresión de la integrina 0, CD11c u otros marcadores de superficie celular identificativos. Con respecto a células, el término "aislada" significa que la célula está sustancialmente libre de otros tipos de células o material celular con el que se produce de manera natural. Por ejemplo, una muestra de células de un fenotipo o tipo de tejido particular es "sustancialmente pura" cuando es al menos el 60% de la población celular. Preferiblemente, la preparación es al menos el 75%, más preferiblemente al menos el 90% y lo más preferiblemente al menos el 99% o el 100%, de la población celular. La pureza se mide mediante cualquier método convencional apropiado, por ejemplo, mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).

Se purifican y/o aíslan composiciones de carga útil tales como polinucleótidos, polipéptidos u otros agentes. Específicamente, tal como se usa en el presente documento, una molécula de ácido nucleico, polinucleótido, polipéptido o proteína "aislada" o "purificada" está sustancialmente libre de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Los compuestos purificados son al menos el 60% en peso (peso seco) el compuesto de interés. Preferiblemente, la preparación es al menos el 75%, más preferiblemente al menos el 90% y lo más

preferiblemente al menos el 99%, en peso el compuesto de interés. Por ejemplo, un compuesto purificado es uno que es al menos el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 98%, el 99% o el 100% (p/p) del compuesto deseado en peso. La pureza se mide mediante cualquier método convencional apropiado, por ejemplo, mediante análisis por cromatografía en columna, cromatografía en capa fina o cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Un polinucleótido purificado o aislado (ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN)) está libre de los genes o las secuencias que lo flanquean en su estado que se produce de manera natural. Los ejemplos de una molécula de ácido nucleico aislada o purificada incluyen: (a) un ADN que forma parte de una molécula de ADN genómico que se produce de manera natural, pero que no está flanqueado por ambas de las secuencias de ácido nucleico que flanquean esa parte de la molécula en el genoma del organismo en el que se produce de manera natural; (b) un ácido nucleico incorporado en un vector o en el ADN genómico de un procarionte o eucariote de una manera tal que la molécula resultante no es idéntica a ningún ADN genómico o vector que se produce de manera natural; (c) una molécula separada tal como un ADNc, un fragmento genómico, un fragmento producido mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o un fragmento de restricción; y (d) una secuencia de nucleótidos recombinante que forma parte de un gen híbrido, es decir, un gen que codifica para una proteína de fusión. Las moléculas de ácido nucleico aisladas según la presente invención incluyen además moléculas producidas de manera sintética, así como cualquier ácido nucleico que se ha alterado químicamente y/o que tiene estructuras principales modificadas.

Una disolución en suspensión es cualquier tampón o disolución compatible con células o fisiológica. Por ejemplo, una disolución en suspensión es medios de cultivo celular o solución salina tamponada con fosfato. Una carga útil es la misma disolución en suspensión o una diferente que también contiene la composición destinada a administrarse al interior de la célula.

Las ventajas del dispositivo incluyen evitar la modificación de la carga útil deseada, y no exponer necesariamente la carga útil a ningún campo electromagnético u otra forma de tensión. Con respecto a la electroporación, se ha mostrado que este método daña proteínas y es ineficaz en cuanto a la administración. Este inconveniente significativo no es un problema con el método descrito en el presente documento; el presente método es particularmente adecuado para administrar cargas útiles sensibles, por ejemplo, proteínas, particularmente proteínas grandes (por ejemplo, 40 kDa - 70 kDa, y hasta 120, 130, 150, 200 kDa o más), constructos de ácido nucleico grandes (por ejemplo, plásmidos y otros constructos que contienen 1 kb, 2 kb, 5 kb, o más de polímeros de ácido nucleico y hasta cromosomas completos), compuestos grandes, así como puntos cuánticos (por ejemplo, 12 nm de diámetro) y otros materiales que se sabe que son sensibles y se dañan fácilmente tras la exposición a electricidad. Por ejemplo, los ligandos de superficie sobre una nanopartícula o un punto cuántico pueden dañarse o cargarse en respuesta a un campo eléctrico, dando como resultado de ese modo la agregación de las partículas limitando/eliminando así su funcionalidad. Aún otra ventaja del método de lesión controlada es el tiempo de la puesta en contacto de las células con la composición de administración. De manera particularmente relevante para proteínas que son sensibles a proteasas, a la temperatura, así como a la electricidad, se ponen en contacto células con disolución de carga útil tras el tratamiento y durante un periodo de tiempo relativamente corto en comparación con métodos anteriores. La naturaleza microfluidica del dispositivo también requiere volúmenes de trabajo más pequeños, ahorrando de ese modo materias primas y/o células valiosas. El dispositivo también puede acoplarse con métodos de administración existentes tales como electroporación o liposomas para producir una administración potenciada en gran medida con respecto a cada método de manera individual.

La actividad funcional de la carga útil administrada está inversamente correlacionada con la tensión de cizalladura del fluido, es decir, la tensión física en la membrana celular tal como estiramiento de la membrana celular, que media en la captación de carga útil en vez de la cizalladura. Los métodos de administración de nanopartículas convencionales pueden dar como resultado que cantidades más grandes de material logren acceso al entorno intracelular de la célula; sin embargo, esos métodos conducen a menos actividad del material administrado en comparación con los métodos descritos en el presente documento debido al hecho de que los métodos anteriores dan como resultado el secuestro del material administrado en endosomas. Los métodos descritos en el presente documento conducen a la administración directa al citosol de compuestos/composiciones de tal manera que una cantidad menor de carga útil administrada en la célula conduce a una cantidad mayor de actividad funcional de las moléculas administradas debido a su accesibilidad a otros componentes citosólicos. Por ejemplo, los métodos anteriores para administrar nanopartículas han dado como resultado 2-10 veces la cantidad de material administrado en la célula pero con poca o ninguna actividad funcional del material administrado debido al secuestro en endosomas. Los dispositivos y métodos de la invención superan este inconveniente de métodos de administración intracelular previos evitando el compartimento endosómico.

Las ventajas y características adicionales incluyen la escala temporal del tratamiento y las velocidades celulares que son mucho más rápidas que los enfoques anteriores. Además, otros métodos no aprietan las células tanto como los presentes métodos, por ejemplo, tal como se determina mediante el tamaño (diámetro) de la célula con respecto al tamaño (diámetro) del estrechamiento (como % del diámetro de la célula). Esta deformación o apriete rápido, forzado, pero por debajo de la piel, conduce a resultados superiores en la captación de carga útil directa al citosol por las células. La deformación de la célula es repentina, es decir, se produce a lo largo de sustancialmente 1  $\mu$ s a 1 ms. En general, demasiada tensión celular inducida por deformación puede resultar letal para la célula, mientras que, al mismo tiempo, demasiada poca tensión no induce perturbaciones celulares. Por tanto, el presente objeto

proporciona métodos y sistemas que provocan una tensión suficiente como para inducir perturbaciones temporales, pero no tanta tensión como para que las perturbaciones sean permanentes y letales para la célula.

5 Cualquiera de los métodos descritos anteriormente se lleva a cabo *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Para aplicaciones *in vivo*, el dispositivo puede implantarse en una luz vascular, por ejemplo, una endoprótesis en línea. Estas y otras capacidades de la invención, junto con la propia invención, se entenderán más completamente tras una revisión de las siguientes figuras, la descripción detallada y las reivindicaciones.

**Breve descripción de las figuras**

10 La figura 1A es un diagrama esquemático de un sistema microfluídico. Se exponen células al material de administración (carga útil) tras pasar a través del estrechamiento.

15 La figura 1B es un diagrama esquemático de un sistema microfluídico. Se exponen células al material de administración (carga útil) a lo largo de todo el procedimiento suspendiendo las células en una disolución que incluye el material de administración (carga útil) (por ejemplo, las células se exponen al material de administración antes y después de pasar a través del estrechamiento).

20 La figura 2A es un diagrama esquemático de una realización de un sistema microfluídico.

La figura 2B es un diagrama de ilustración de un sistema microfluídico que representa profundidad, anchura y longitud.

25 La figura 3 es un diagrama esquemático de un sistema microfluídico.

La figura 4 es un diagrama esquemático que muestra perturbaciones en una pared celular.

La figura 5 es una fotografía de un sistema microfluídico.

30 La figura 6 es una fotografía de un sistema microfluídico.

La figura 7 es una fotografía de un sistema microfluídico.

35 Las figuras 8A-8B son gráficos que muestran resultados a modo de ejemplo obtenidos a partir de un sistema microfluídico.

La figura 9 es un gráfico que muestra resultados a modo de ejemplo obtenidos a partir de células que se procesaron usando un sistema microfluídico.

40 La figura 10 es un gráfico que muestra resultados a modo de ejemplo obtenidos a partir de células que se procesaron usando un sistema microfluídico.

45 La figura 11 es un gráfico que muestra resultados a modo de ejemplo obtenidos a partir de células que se procesaron usando un sistema microfluídico.

La figura 12 es un diagrama esquemático de un sistema microfluídico.

50 La figura 13 es un gráfico que muestra resultados a modo de ejemplo obtenidos a partir de células que se procesaron usando un sistema microfluídico.

La figura 14 es un gráfico que muestra resultados a modo de ejemplo obtenidos a partir de células que se procesaron usando un sistema microfluídico.

55 La figura 15 es un gráfico que muestra resultados a modo de ejemplo obtenidos a partir de células que se procesaron usando un sistema microfluídico.

Las figuras 16A-16F son diagramas esquemáticos a modo de ejemplo de sistemas microfluídicos.

60 La figura 17 es un diagrama de flujo referente a un método de uso de un sistema microfluídico.

Las figuras 18A-18B son gráficos que muestran resultados a modo de ejemplo obtenidos a partir de células que se procesaron usando un sistema microfluídico.

65 La figura 19 es una superposición de imágenes de transmisión y de fluorescencia confocal, seguidas por imágenes de fluorescencia confocal en sección z de células tratadas a las que se administraron puntos cuánticos (QD) usando el presente objeto.

- 5 La figura 20A ilustra la eficiencia de administración en el citosol de células HeLa tras el tratamiento del presente objeto con QD recubiertos con ligando de poli-imidazol (PIL). La viabilidad celular era >80% tal como se midió mediante citometría de flujo.
- 10 La figura 20B ilustra la viabilidad de células HeLa tras la administración de QD535 solo mediante el presente objeto, tal como se midió mediante tinción con yoduro de propidio y medición por citometría de flujo.
- 15 La figura 21 ilustra el diseño de constructo, la absorbancia y la estabilidad en diversos medios.
- 20 La figura 22A ilustra imágenes de microscopía confocal de células vivas de células tratadas y de control.
- La figura 22B ilustra un cambio en la intensidad de células tratadas en función del tiempo en los canales verde y rojo.
- La figura 23 ilustra mediciones de citometría de flujo de viabilidad y fluorescencia celular promedio.
- La figura 24 ilustra la obtención de imágenes por epifluorescencia de puntos cuánticos individuales sin agregar dentro del citosol celular tras el tratamiento con dispositivo con una disolución de puntos cuánticos 10 nM, y perfiles de parpadeo de tres puntos cuánticos con autofluorescencia.
- La figura 25 ilustra resultados experimentales que muestran que el rendimiento de la administración depende de la velocidad celular y el diseño del estrechamiento.
- 25 La figura 26 ilustra exploraciones de diferentes planos horizontales de una célula HeLa tras la administración de dextrano 3 kDa conjugado con azul pacífico, tal como se midió mediante microscopía confocal.
- La figura 27 ilustra un modelo de difusión en 2D simplificado que simula la difusión pasiva de material en una célula a través de una membrana sometida a poración.
- 30 La figura 28 ilustra los resultados de una administración en dos niveles de material.
- La figura 29 ilustra datos referentes a la administración de ARNip, proteínas y nanopartículas.
- 35 La figura 30 ilustra la aplicabilidad del presente objeto a lo largo de tipos de células.
- La figura 31 ilustra datos a partir de la administración de nanomateriales y anticuerpos.
- 40 La figura 32 ilustra aplicaciones de administración de proteínas.
- La figura 33 es una tabla de tipos de células a modo de ejemplo, en las que se ha administrado satisfactoriamente carga útil.
- 45 La figura 34 es una ilustración que representa un sistema en el que se trata la sangre de un paciente mediante un dispositivo microfluídico para la administración de carga útil tal como macromoléculas.
- La figura 35 ilustra la eficiencia de administración y viabilidad de células madre embrionarias humanas tratadas con un dispositivo de 10  $\mu\text{m}$  - 6  $\mu\text{m}$  para administrar carga útil.
- 50 La figura 36 representa la generación y caracterización de líneas de iPSC de ratón y humanas mediante administración directa de proteínas de reprogramación fusionadas usando el presente objeto.
- La figura 37 representa resultados de reprogramación de proteínas preliminares y representa la expresión del marcador de células madre embrionarias humanas Oct4, SSEA-4, Tra-60, Tra-80, fosfatasa alcalina (AP) en colonias de iPSC.
- 55 La figura 38 representa microfotografías que ilustran un dispositivo modificado mediante electrodos incorporados a cada lado del estrechamiento mediante formación de patrones por fotolitografía y deposición de Au para introducir un campo eléctrico localizado en el canal combinando así la deformación celular con electroporación.
- 60 La figura 39 representa otra realización del sistema microfluídico en el que la porción de entrada tiene un ángulo de estrechamiento de 90 grados.
- 65 La figura 40 representa representaciones gráficas que muestran una comparación de viabilidad y eficiencia de administración entre un dispositivo según la realización de ejemplo representada en la figura 2A y un dispositivo según una realización de ejemplo representada en la figura 39.

La figura 41 representa histogramas de la expresión de CD45 de células T activadas tal como se midió mediante un anticuerpo Alexa 488 frente a CD45. Las células que se tratan mediante el dispositivo en presencia de ARN que silencia CD45 muestran un pico de intensidad de fluorescencia inferior indicando de ese modo un silenciamiento de la expresión génica de CD45.

La figura 42 es una ilustración que representa varios campos de aplicación de ejemplo tales como medicina regenerativa; inmunología; obtención de imágenes y detección; y vacunas contra el cáncer e investigación contra el cáncer.

Las figuras 43A y 43B son histogramas de intensidad a partir de citometría de flujo de una población de control que se expone a dextrano de 3 kDa conjugado con azul cascada y una población de células que se han sometido a un dispositivo de 30  $\mu\text{m}$  - 6  $\mu\text{m}$  y después se han expuesto al dextrano de 3 kDa.

La figura 44 es un gráfico de barras que ilustra el silenciamiento de GFP en células madre embrionarias humanas tras el tratamiento usando el dispositivo microfluídico y métodos relacionados.

Las figuras 45A y 45B son dos representaciones gráficas que ilustran la intensidad de colorante y viabilidad de células madre embrionarias humanas tras la administración de un colorante azul de 3 kDa.

### Descripción detallada

Realizaciones de la invención proporcionan técnicas para aplicar deformación controlada a una célula durante una cantidad de tiempo predeterminada con el fin de provocar perturbaciones en la membrana celular de tal manera que pueden administrarse materiales al interior de la célula. La deformación puede provocarse, por ejemplo, mediante presión inducida mediante esfuerzo mecánico o fuerzas de cizalladura. En un ejemplo, un sistema microfluídico incluye una estructura que controla y/o manipula fluidos confinando geoméricamente los fluidos en una escala pequeña (por ejemplo, volúmenes inferiores al mililitro tales como microlitros, nanolitros o picolitros). El sistema microfluídico es capaz de administrar de manera intracelular prácticamente cualquier carga útil en una célula. El sistema consiste en uno o más canales microfluídicos con un estrechamiento a través del cual las células pasan a través. Preferiblemente, las células fluyen a través del canal microfluídico suspendidas en un medio líquido que se impulsa mediante presión a través del sistema. Cuando una célula pasa a través del estrechamiento, su membrana se ve perturbada provocando alteraciones temporales en la membrana y dando como resultado la captación de la carga útil que está presente en los medios circundantes. El estrechamiento depende del tamaño de la célula diana, pero preferiblemente es del mismo orden o menor que el diámetro celular. Pueden colocarse múltiples estrechamientos en paralelo y/o en serie. La perturbación en la célula es una rotura en la célula que permite que material del exterior de la célula se mueva en la célula (por ejemplo, un orificio, un rasgado, una cavidad, una abertura, un poro, una rotura, un hueco, una perforación). Las perturbaciones (por ejemplo, poros u orificios) creadas mediante los métodos descritos en el presente documento no se forman como resultado de ensamblaje de subunidades de proteína para formar una estructura de poro multimérica tal como la creada mediante complemento o hemolisinas bacterianas. Otras realizaciones están dentro del alcance de las reivindicaciones de la presente invención.

Haciendo referencia a las figuras 1-3, un sistema 5 microfluídico incluye un canal 10 que define una luz tubular. El canal 10 microfluídico incluye un estrechamiento 15 que está configurado preferiblemente de tal manera que sólo una única célula 20 diana puede pasar a través del estrechamiento 15 cada vez. Preferiblemente, las células 20 pasan a través del canal 10 suspendidas en un tampón 25 de disolución que también incluye materiales 30 de administración, aunque los materiales de administración pueden añadirse al tampón 25 de disolución después de que pasen las células 20 a través del estrechamiento 15. A medida que la célula 20 se aproxima y pasa a través del estrechamiento 15, el estrechamiento 15 aplica presión (por ejemplo, compresión mecánica) a la célula 20, apretando la célula 20 (por ejemplo, mostrada como célula 20<sub>1</sub>). La presión aplicada a la célula por el estrechamiento 15 provoca perturbaciones (por ejemplo, orificios mostrados en la figura 4) en la membrana celular (por ejemplo, célula 20<sub>2</sub>). Una vez que la célula pasa a través del estrechamiento 15, la célula 20 comienza a captar el material en el tampón 25 de disolución a través de los orificios, incluyendo el material 30 de administración (por ejemplo, célula 20<sub>3</sub>). La membrana celular se recupera a lo largo del tiempo, y al menos una porción del material 30 de administración permanece preferiblemente atrapado dentro de la célula.

La configuración del estrechamiento 15 puede personalizarse para controlar el estrechamiento de la célula 20, controlando así la presión aplicada a la célula 20. Preferiblemente, el estrechamiento 15 incluye una porción 35 de entrada, un punto 40 central y una porción 45 de salida. Por ejemplo, el/los diámetro(s) del estrechamiento 15 puede(n) hacerse variar para ajustar la presión aplicada a la célula (y con qué rapidez se aplica/libera esa presión), y la longitud del estrechamiento 15 puede hacerse variar para ajustar la cantidad de tiempo durante el cual se aplica presión a la célula. En determinadas configuraciones, no se requiere un estrechamiento físico de la célula, en vez de eso, someter de manera muy breve la célula a una tasa de cizalladura y/o tasa de compresión inusualmente alta puede provocar las perturbaciones deseadas. Generalmente, no hay ningún requisito relacionado con el diámetro externo del sistema microfluídico y puede hacerse variar la razón del diámetro interno con respecto al diámetro

externo (por ejemplo, mayor de 5).

El diámetro del punto 40 central puede ser función del diámetro de la célula 20. Preferiblemente, el punto 40 central es del mismo orden, o menor, que el diámetro de la célula 20 (por ejemplo, el 20-99% del diámetro de la célula). Preferiblemente, el diámetro del punto 40 central es de entre el 60% y el 70% del diámetro de la célula, aunque el diámetro del punto central óptimo puede variar basándose en la aplicación y/o el tipo de célula. Los diámetros a modo de ejemplo del punto 40 central que se han usado en experimentos anteriores son de 5-6  $\mu\text{m}$  y 7-8  $\mu\text{m}$ . El punto 40 central también puede ser más grande que el diámetro de la célula 20, pero estar configurado para provocar un pulso de presión (por ejemplo, cizalladura) que se aplica a la célula 20. Tal presión puede aplicarse a la célula 20 sin que toque las paredes del canal 10. La cizalladura puede medirse mediante técnicas conocidas (por ejemplo, Journal of Applied Physics 27, 1097 (1956); Murphey *et al.*).

El ángulo de estrechamiento (por ejemplo,  $\alpha$  en la figura 2A) de la porción 35 de entrada puede variar (por ejemplo, con qué rapidez disminuye el diámetro). El ángulo de estrechamiento es preferiblemente un ángulo que minimiza la obstrucción del sistema 5 mientras las células están pasando a través del mismo. El ángulo de la porción 45 de salida también puede variar. Por ejemplo, el ángulo de la porción 45 de salida está configurado para reducir la probabilidad de turbulencia/corrientes parásitas que pueden dar como resultado un flujo no laminar (por ejemplo, un intervalo de desde 1-80 grados). Las paredes de la porción 35 de entrada y/o la porción 45 de salida son preferiblemente lineales, aunque son posibles otras configuraciones (por ejemplo, las paredes pueden ser curvadas).

La sección transversal del canal 10, la porción 35 de entrada, el punto 40 central y la porción 45 de salida pueden variar. Por ejemplo, las diversas secciones transversales pueden ser circulares, elípticas, una hendidura alargada, cuadradas, hexagonales, triangulares, etc. La longitud del punto 40 central también puede variar, y puede ajustarse para hacer variar la cantidad de tiempo durante el cual se aplica presión a la célula 20 a medida que pasa a través del estrechamiento 15. A una velocidad de flujo dada, un estrechamiento 15 más largo (por ejemplo, un punto 40 central más largo) aplicará presión a la célula 20 durante un periodo de tiempo más prolongado. La profundidad del canal 10, la porción 35 de entrada, el punto 40 central y la porción 45 de salida puede variar. Por ejemplo, la profundidad puede ajustarse para proporcionar un estrechamiento más estrecho y potenciar así la administración de una manera similar a cambios en la anchura de estrechamiento. La anchura y longitud varían entre diseños de dispositivo y pueden determinarse durante la fabricación del dispositivo, tal como mediante una máscara cromática usada en una etapa de litografía (cuando el dispositivo se basa en silicio). La profundidad puede ser uniforme a lo largo de todo el canal y puede determinarse durante la fabricación del dispositivo, tal como mediante una etapa de grabado químico profundo por iones reactivos. La profundidad puede ser, por ejemplo, de 15  $\mu\text{m}$  - 20  $\mu\text{m}$ . Tal como se usa en el presente documento, las dimensiones del dispositivo se indican mediante una serie de números que indican la longitud, la anchura y el número de estrechamientos (por ejemplo, 30  $\mu\text{m}$  - 6  $\mu\text{m}$  x 5 indica un dispositivo con una longitud de 30  $\mu\text{m}$ , una anchura de 6  $\mu\text{m}$  y 5 estrechamientos).

También puede hacerse variar la velocidad a la que las células 20 pasan a través del canal 10 para controlar la administración del material 30 de administración a las células 20. Por ejemplo, ajustar la velocidad de las células 20 a través del canal 10 puede hacer variar la cantidad de tiempo durante el cual se aplica presión a las células, y puede hacer variar con qué rapidez se aplica la presión a la célula (por ejemplo, lentamente o por choques). Las células 20 pasan a través del sistema 5 a una velocidad de al menos 0,1 mm/s, tal como de 0,1 mm/s a 5 m/s, y preferiblemente entre 10 mm/s y 500 mm/s, aunque son posibles otras velocidades. En algunas realizaciones, las células 20 pueden pasar a través del sistema 5 a una velocidad mayor de 5 m/s.

El canal 10 puede fabricarse a partir de diversos materiales tales como silicio, vidrio, materiales cerámicos, sustratos cristalinos, sustratos amorfos y polímeros (por ejemplo, poli(metacrilato de metilo) (PMMA), PDMS, copolímero de olefina cíclica (COC), etc.). La fabricación se basa preferiblemente en una sala limpia, y puede usar, por ejemplo, grabado químico en seco, grabado químico en húmedo, fotolitografía, moldeo por inyección, ablación por láser, máscaras de SU-8, etc. Un canal 10 a modo de ejemplo tiene aproximadamente 40-50  $\mu\text{m}$  de longitud, teniendo un diámetro sin estrechamiento de aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ , teniendo un diámetro de estrechamiento de aproximadamente 4-8  $\mu\text{m}$ . Preferiblemente, la longitud del canal 10 se mantiene corta para evitar obstrucciones. Otras dimensiones son posibles.

La figura 39 representa otra realización del sistema microfluídico. En esta realización, el canal 10 incluye una porción 50 de entrada preliminar que no aprieta la célula 20. Una porción 55 de canal expandida proporciona que la porción 35 de entrada tenga un ángulo de estrechamiento de 90 grados (por ejemplo, alfa en la figura 2A).

La figura 40 muestra dos representaciones gráficas que muestran una comparación de viabilidad y eficiencia de administración entre dos realizaciones de ejemplo. La etiqueta 4000 indica medidas tomadas mientras se usaba una realización según la figura 2A, mientras que 4010 indica medidas tomadas mientras se usaba una realización según la figura 39. Para la misma velocidad celular y presión de funcionamiento, se ha mostrado que la realización de la figura 39 tiene una alta eficiencia de administración y viabilidad. Esto es, a pesar de tener tasas de cizalladura, velocidad celular y tiempo pasado en compresión similares a la realización de la figura 2A.

Varios parámetros pueden influir en la administración del material 30 de administración en la célula 20. Por ejemplo, las dimensiones del estrechamiento 15, las velocidades de flujo de funcionamiento (por ejemplo, el tiempo de tránsito de células hasta el estrechamiento 15), la concentración del material 30 de administración en el tampón 25 de disolución y la cantidad de tiempo durante el cual la célula 20 se recupera/incuba en el tampón 25 de disolución tras el estrechamiento pueden afectar a la absorción del material 30 de administración en la célula 20. Los parámetros adicionales que influyen en la administración del material 30 en la célula 20 pueden incluir la velocidad de la célula 20 en el estrechamiento 15, la tasa de cizalladura en el estrechamiento 20, la componente de velocidad que es perpendicular a la velocidad de flujo, una tasa de compresión de célula y el tiempo en el estrechamiento. Tales parámetros pueden diseñarse para controlar la administración del material 30 de administración. La composición del tampón 25 de disolución (por ejemplo, concentración de sal, contenido en suero, etc.) también puede tener un impacto sobre la administración del material 30 de administración. A medida que la célula 20 pasa a través del estrechamiento 15, la deformación/tensión inducida por el estrechamiento 15 provoca temporalmente la lesión de la célula lo cual provoca la difusión pasiva de material a través de la perturbación. En algunas realizaciones, la célula 20 sólo se deforma durante un breve periodo de tiempo, del orden de 100  $\mu$ s, para minimizar la probabilidad de activar rutas apoptóticas mediante mecanismos de señalización celular, aunque son posibles otras duraciones (por ejemplo, que oscilan desde nanosegundos hasta horas). Observaciones iniciales han indicado que la absorción del material 30 de administración por la célula 20 se produce en el orden de minutos tras pasar la célula 20 a través del estrechamiento 15.

Las células 20 pueden impulsarse a través del canal 10 mediante diversos métodos. Por ejemplo, puede aplicarse presión mediante una bomba en el lado de entrada (por ejemplo, cilindro de gas o compresor), puede aplicarse un vacío mediante una bomba de vacío en el lado de salida, acción capilar a través de un tubo y/o el sistema 5 puede alimentarse por gravedad. También pueden usarse sistemas de flujo basados en desplazamiento (por ejemplo, bomba de jeringa, bomba peristáltica, pipeta o jeringa manual, pistones, etc.). Las velocidades de flujo a modo de ejemplo a través de un único canal 10 son del orden de 1  $\mu$ l en unos pocos segundos. Adicionalmente, el tampón 25 de disolución puede incluir uno o más lubricantes (compuestos Pluronic u otros tensioactivos) que pueden diseñarse para reducir o eliminar la obstrucción del canal 10 y mejorar la viabilidad.

El sistema 5 puede controlarse para garantizar que las cantidades de administración del material 30 de administración sean constantes a lo largo de la población celular. Por ejemplo, el sistema 5 puede incluir el uso de un mecanismo de administración por convección tras el estrechamiento que hace impactar material 30 de administración sobre la membrana celular permeabilizada de la célula 20. Controlando la velocidad de flujo de la corriente secundaria, puede controlarse preferiblemente la cantidad de material 30 de administración proporcionada a la célula. Adicionalmente, controlando la concentración de material 30 de administración en el tampón 25 de disolución durante la recuperación de la membrana también puede mejorar la sistematicidad de la administración del material 30 de administración a la población de células. Preferiblemente, el sistema 5 funciona como un sistema puramente mecánico sin aplicar ningún campo eléctrico y/o agente químico, aunque son posibles otras configuraciones (por ejemplo, pueden usarse sensores eléctricos y/u ópticos para medir propiedades de células tales como fluorescencia). Adicionalmente, el sistema 5 funciona preferiblemente de manera independiente del tipo de material que está administrándose. Por ejemplo, pueden administrarse proteínas, ARN y ADN a través del mismo sistema sin ninguna modificación adicional.

En algunas configuraciones con determinados tipos de células 20, las células 20 pueden incubarse en una o más disoluciones que ayudan en la absorción del material de administración al interior de la célula. Por ejemplo, las células 20 pueden incubarse en una disolución de despolimerización tal como lantrunculina A (0,1  $\mu$ g/ml) durante 1 hora antes de la administración para despolimerizar el citoesqueleto de actina. Como ejemplo adicional, las células pueden incubarse en colchicina 10  $\mu$ M (Sigma) durante 2 horas antes de la administración para despolimerizar la red de microtúbulos. Estos métodos pueden ayudar a obtener la expresión génica cuando se administra ADN.

Haciendo también referencia a la figura 5, se muestra una fotografía de una configuración en paralelo del sistema 5. El sistema 5 puede incluir cualquier número de canales paralelos. Preferiblemente, a medida que se añaden canales paralelos adicionales al sistema 5, puede aumentarse el rendimiento global del sistema 5. La figura 6 muestra una fotografía de una configuración en paralelo del sistema 5 que incluye filtros en la entrada de cada uno de los canales 10. Adicionalmente, la figura 6 también muestra una configuración del estrechamiento 15 que incluye una porción 35 de entrada que incluye múltiples etapas. Haciendo también referencia a la figura 7, se muestra una fotografía adicional de un prototipo del sistema 5. Tal como resulta evidente en la figura 7, el prototipo, que incluye un pocillo de incubación, tiene dimensiones de aproximadamente 2,54 cm x 0,635 cm x 0,635 cm (1 pulgada x ¼ de pulgada x ¼ de pulgada). Otras configuraciones del sistema 5 también pueden incluir dispositivos de clasificación, módulos de previos al tratamiento/posteriores al tratamiento y/o módulos de sensor (por ejemplo, ópticos, eléctricos y magnéticos).

Tal como se describe en más detalle a continuación con respecto a los ejemplos, el sistema microfluídico y los métodos relacionados tienen una amplia gama de aplicaciones. La figura 42 es una ilustración que representa varios campos de aplicación de ejemplo. Por ejemplo, el presente objeto puede aplicarse a medicina regenerativa tal como para permitir la reprogramación celular y diferenciación de células madre. El presente objeto puede aplicarse a inmunología, tal como para presentación de antígeno y potenciación/supresión de actividad inmunitaria mediante

administración a células dendríticas, monocitos, células T, células B y otros linfocitos. Además, la obtención de imágenes y detección pueden beneficiarse de la administración mejorada para células diana de puntos cuánticos, nanotubos de carbono y anticuerpos. Adicionalmente, el presente objeto tiene aplicación en vacunas e investigación contra el cáncer, tal como para el aislamiento de células tumorales circulantes (CTC) y tratamiento de linfoma. El método también proporciona una plataforma robusta para examinar la detección de ARNip y compuestos de molécula pequeña activos capaces de tratar una enfermedad o manipular el comportamiento de células.

Este concepto se ha demostrado satisfactoriamente en un prototipo en el que se indujeron las células 20 para captar de otro modo colorante impermeable a la membrana (por ejemplo, colorantes fluorescentes con una masa molecular de desde 3 kDA hasta 2 MDA, ADN, proteínas, ARN, nanotubos o nanopartículas presentes en el tampón 25 de disolución). Se ha mostrado que las células 20 se recuperan y proliferan después del procedimiento al tiempo que conservan el material administrado durante más de 72 horas. Se han sometido a prueba once tipos de células diferentes con este sistema, incluyendo los indicados en la figura 33, demostrando así que el sistema proporciona un rendimiento robusto en diferentes tipos de células. La figura 33 es una tabla que incluye tipos de células en los que se ha aplicado satisfactoriamente el presente objeto. Se ha medido que el rendimiento celular promedio es del orden de 5.000-20.000 células/segundo, se ha medido que la eficiencia de administración promedio es del 96%, y se ha medido que la viabilidad celular es del 95% usando un único canal 10. Todas las pruebas se realizaron a temperatura ambiente. Sin embargo, la temperatura puede hacerse variar en algunas técnicas. Por ejemplo, los métodos pueden llevarse a cabo a temperatura ambiente (por ejemplo, 20°C), temperatura fisiológica (por ejemplo, 39°C), superior a la temperatura fisiológica o temperatura reducida (por ejemplo, 4°C), o temperaturas entre estas temperaturas a modo de ejemplo. Realizar los métodos a una temperatura reducida (es decir, sustancialmente cerca de 4°C, lo cual puede lograrse, por ejemplo, usando refrigeración, baño de hielo u otras técnicas conocidas), ha producido una mejora sorprendente en la eficiencia de administración y viabilidad celular. Por tanto, la temperatura puede ajustarse para afectar a la administración de la composición y la viabilidad celular.

Tal como se muestra en las figuras 8A-B, aumentar la velocidad celular a través del estrechamiento 15 puede aumentar el porcentaje de administración y la eficiencia de administración del material 30 de administración. Se encontró que la eficiencia de administración varía de manera lineal con la velocidad celular, y que había una respuesta dependiente de la dosis.

Tal como se muestra en la figura 9, el tiempo de incubación de una célula en el tampón 25 de disolución después de que la célula pase al estrechamiento 15 puede tener un efecto sobre el porcentaje de administración global del material 30 de administración a la célula 20. Sin embargo, se observó que, después de una determinada cantidad de tiempo de incubación (aproximadamente 2-3 minutos), el porcentaje de administración no cambiaba sustancialmente. Basándose en estos datos, se cree que las perturbaciones provocadas en la célula 20 después de que pase a través del estrechamiento 15 se corrigen dentro del orden de aproximadamente cinco minutos después de que la célula 20 pase al estrechamiento 15. Adicionalmente, y como referencia, -1 minuto corresponde al grupo de control.

Tal como se muestra en la figura 10, se observó que hacer pasar las células 20 a través del estrechamiento 15 múltiples veces puede tener un efecto sobre el porcentaje de administración global, pero que afectó negativamente a la viabilidad global de las células 20. Para generar estos datos, se hicieron pasar células a través del estrechamiento 15, se recogieron y se hicieron pasar de nuevo a través del dispositivo dentro del plazo de aproximadamente 1 minuto.

Se ha observado que, durante el tiempo que se encuentran perturbadas las células 20 (por ejemplo, después de pasar a través del estrechamiento 15), puede extraerse ese material a partir del interior de la célula a través de las perturbaciones. Por tanto, se ha encontrado que cuando las células 20 se encuentran perturbadas, ese material puede fluir al interior y al exterior de la célula 20. Esta propiedad significa que el sistema 5 puede usarse como un método de muestreo de material intracelular sin someter a lisis la célula. Las perturbaciones en la membrana celular darán como resultado preferiblemente un flujo de salida de macromoléculas del citoplasma y, por tanto, pueden usarse para analizar a modo de sonda la composición del citoplasma.

Tal como se muestra en la figura 11, se trataron células HeLa que expresaban proteína verde fluorescente (GFP) estable en presencia de ARNip de silenciamiento de GFP (Ambion, EE.UU.) y se analizaron mediante FACS (FACS Canto II, BD Biosciences, EE.UU.) a las 48 horas para determinar el silenciamiento de la fluorescencia. Los resultados en la figura 11 indican >40% de silenciamiento de la expresión génica, un resultado comparable al de reactivos comerciales tales como Lipofectamine 2000 (Invitrogen, EE.UU.). Los controles de ARNip reorganizado al azar, también en la figura 11, indican que este silenciamiento no está provocado por el propio procedimiento de deformación.

Tal como se muestra en las figuras 13-14 y, las dimensiones de apriete pueden tener un efecto sobre la eficiencia de administración global del material 30 de administración. Por ejemplo, las figuras 13-14 muestran que a medida que se hace variar la presión de funcionamiento (por ejemplo, haciendo variar la longitud y/o la anchura del estrechamiento 15) la eficiencia de administración global varía en cierta medida (la figura 14 se refiere a la administración de puntos cuánticos (nanopartículas) en diferentes condiciones). Además, tal como se muestra en las

figuras 18A-18B, las velocidades celulares estimadas pueden tener un efecto sobre la viabilidad global y la eficiencia de administración del material 30 de administración. Por ejemplo, la figura 18A muestra que a medida que se hace variar la velocidad de funcionamiento, la eficiencia de administración global varía en cierta medida. Adicionalmente, la figura 18B muestra que a medida que se hace variar la velocidad de funcionamiento, la viabilidad de las células puede variar en cierta medida. Estas figuras muestran que un cambio en la longitud de estrechamiento puede potenciar la administración al tiempo que tiene un impacto mínimo sobre la viabilidad. Adicionalmente, moléculas más grandes entran en la célula a una tasa inferior tras el estrechamiento que moléculas más pequeñas. Este método de administración intracelular descrito en el presente documento es "universal" en cuanto a que funciona para muchos tipos diferentes de materiales y células. Además, las alteraciones de membrana inducidas mediante este dispositivo pueden tener normalmente un tamaño de al menos ~100 nm, aunque son posibles alteraciones de otro tamaño.

Haciendo referencia a la figura 12, en una implementación, puede controlarse el gradiente de concentración entre el tampón 25 de disolución y el citosol para controlar de manera predecible la cantidad de material administrado. Pueden usarse métodos de administración localizada que exponen las células 20 a una nube concentrada de macromoléculas después de que las células 20 se hayan sometido a poración mediante el estrechamiento. Sin embargo, cualquier método de administración localizada de este tipo debe tener en cuenta el tiempo de resellado de perturbación estimado para garantizar una función apropiada. Esto puede implementarse incorporando una "microboquilla" perpendicular al canal que administre una alta concentración de la carga útil a las inmediaciones de la membrana celular (ilustrado en la figura 6A). Preferiblemente, la microboquilla puede estar ubicada en y/o cerca del estrechamiento 15. Un enfoque de este tipo puede permitir complementar el mecanismo de administración por difusión con un componente de convección permitiendo de ese modo una carga de células más precisa con concentraciones superiores. Preferiblemente, la inyección tiene lugar mientras la célula 20 está en una zona de alta concentración del estrechamiento 15. Una técnica localizada tiene la ventaja añadida de ahorrar materiales de administración valiosos porque entonces no es necesario mantener una alta concentración a través de todo el tampón.

Haciendo referencia a la figura 16A, puede usarse una serie de micropilares 100 para aplicar presión a las células 20 de tal manera que se provoca una perturbación. En esta implementación, las células 20 se fuerzan a través de una matriz de pilar de estrechamiento de tal manera que se aplica presión a las células 20.

Haciendo referencia a la figura 16B, pueden usarse placas 105 de compresión para aplicar presión a las células 20 de tal manera que se provoca una perturbación. En esta implementación, las placas 105 de compresión pueden controlarse de tal manera que se aplica presión a las células 20 durante una cantidad de tiempo predefinida. Las placas 105 de compresión pueden configurarse de tal manera que una o ambas placas se muevan para aplicar presión a las células 20. También puede suministrarse un conjunto adicional de placas 105 de compresión de tal manera que las células 20 estén sustancialmente rodeadas.

Haciendo referencia a la figura 16C, pueden usarse aditivos 115 de tampón (o materiales de carga unidos a la superficie celular) para simular el apriete a medida que la célula 20 pasa a través de un estrechamiento 15 que es más grande que el diámetro de la célula 20. Por ejemplo, es posible un estrechamiento simulado debido a interferencia mediante los aditivos 115 de tampón. Los ejemplos de aditivos 115 de tampón incluyen micro o nanopartículas (por ejemplo, basadas en polímero, basadas en lípido, basadas en compuesto cerámico, metálicas, etc.). Estas partículas se marcan con un ligando de unión a célula tal como un anticuerpo, una secuencia de ADN, un péptido o una molécula pequeña, aunque esto no se requiere.

Haciendo referencia a la figura 16D, pueden usarse perlas 120 para comprimir la célula 20. Por ejemplo, puede usarse fuerza magnética y/o electrostática para aplicar presión a la célula 20 o, en el caso de la figura 16E, para tirar de la célula 20. Preferiblemente, la fuerza aplicada a la célula 20 es suficiente para provocar una perturbación.

Haciendo referencia a la figura 16F, pueden dirigirse múltiples corrientes 125 de fluido de tal manera que se provoca compresión (o cizalladura transitoria rápida) de la célula 20. Por ejemplo, las múltiples corrientes 125 de fluido pueden lanzarse de tal manera que se aproximan o impactan entre sí. A medida que las células 20 pasan a través de las múltiples corrientes 125 de fluido, puede aplicarse fuerza a las células 20 de tal manera que se provoca una perturbación en la membrana de la célula 20. Alternativamente, pueden lanzarse células a través de una boquilla de tipo hendidura estrecha para facilitar la administración.

El sistema 5 puede ser un sistema independiente, tal como el mostrado en la figura 7, aunque son posibles otras configuraciones. Por ejemplo, el sistema 5 puede implantarse *in vivo* en un paciente para la administración intracelular local, y/o incorporarse *ex vivo* en una máquina para el tratamiento de células antes de devolver las células al paciente.

Además de sus ventajas de administración descritas en el presente documento, la naturaleza microfluidica del sistema permite ejercer un control preciso sobre las condiciones de administración, antes del tratamiento y la posterior caracterización de células. Por ejemplo, el sistema puede implementarse en serie con un módulo de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Esto puede permitir la administración y clasificación de las

células deseadas en el mismo sistema, en tiempo real. También pueden desplegarse diversas técnicas de ensayo antes del tratamiento y después de la clasificación, permitiendo por tanto de ese modo el desarrollo de ensayos continuos, de alto rendimiento, para el examen de fármacos y diagnóstico.

5 La eficiencia de administración de una carga útil administrada a células diana se determina sometiendo una población de control de células diana a una carga útil así como una población que se ha sometido a tratamiento mediante un dispositivo microfluídico. La muestra de control se expone a la misma disolución de administración, a la misma concentración, durante al menos la misma cantidad de tiempo que las células tratadas mediante el dispositivo. Para compensar la unión a superficie, la endocitosis y otros efectos tales como autofluorescencia, se define una región sometida a administración de tal manera que sólo el 1-5% superior de las células de control vivas se encuentran dentro de esta región. Por tanto, la eficiencia de administración de una muestra corresponde al porcentaje de células vivas que están en la región sometida a administración. Por ejemplo, la figura 43A es un histograma de intensidad a partir de citometría de flujo de una población de control que se expone a dextrano de 3 kDa conjugado con azul cascada. La figura 43B es un histograma de intensidad a partir de citometría de flujo de células que se han sometido a un dispositivo de 30  $\mu\text{m}$  - 6  $\mu\text{m}$ . La región sometida a administración definida es la región no sombreada tanto en 43A como en 43B.

En funcionamiento, haciendo referencia a la figura 17, con referencia adicional a las figuras 1-3, un procedimiento 1000 para realizar la administración intracelular del sistema 5 incluye las etapas mostradas. Sin embargo, el procedimiento 1000 es únicamente a modo de ejemplo y no limitativo. El procedimiento 1000 puede alterarse, por ejemplo, añadiendo, eliminando, alterando o reordenando etapas.

En la etapa 1005, se suspenden las células 20 en el tampón 25 de disolución junto con los materiales 30 de administración. Las concentraciones de células típicas pueden oscilar desde  $10^4$  hasta  $10^9$  células/ml. Las concentraciones de material de administración pueden oscilar desde 10 mg/ml hasta 0,1  $\mu\text{g/ml}$ . El material de administración puede añadirse al tampón celular antes o inmediatamente después de la administración dependiendo de la configuración deseada dado que las lesiones/poros permanecen abiertos durante 1-5 minutos. Los tampones de disolución pueden estar compuestos por varias sales, azúcares, factores de crecimiento, productos de origen animal o cualquier otro componente necesario para una proliferación celular apropiada, un mantenimiento de la salud celular o una inducción de rutas de señalización celular. También pueden añadirse materiales adicionales al tampón 25 de disolución. Por ejemplo, pueden añadirse tensioactivos (por ejemplo, compuestos Pluronic) y/o materiales de carga al tampón 25 de disolución.

En la etapa 1010, el tampón 25 de disolución que incluye las células 20 y los materiales 30 de administración se hacen pasar a través del canal 10 del sistema 5. El tampón 25 de disolución puede pasar a través del canal 10 usando la gravedad o puede verse ayudado por otros métodos. Por ejemplo, puede aplicarse presión al tampón 25 de disolución en el lado de entrada del canal 10 (por ejemplo, usando un cilindro de gas y/o compresor), y/o puede aplicarse un vacío mediante una bomba de vacío en el lado de salida. Adicionalmente, también pueden usarse sistemas de flujo basados en desplazamiento.

A medida que las células 20 individuales pasan a través del estrechamiento 15, se aplica momentáneamente una presión a la célula 20 mediante la construcción maciza del estrechamiento 15 provocando que se desarrollen perturbaciones tales como orificios en la membrana celular de tal manera que los materiales 30 de administración pueden administrarse al interior de la célula 20. La cantidad y/o la duración de la presión aplicada a la célula 20 pueden hacerse variar ajustando las dimensiones del estrechamiento 15, la velocidad a la que pasa la célula 20 a través del estrechamiento 15 y/o ajustando la forma del estrechamiento 15. En una configuración, pasan aproximadamente 5.000-20.000 células/segundo a través del estrechamiento 15, y cada célula se aprieta durante aproximadamente 100  $\mu\text{s}$ .

El sistema 5 puede incluir uno o más de los canales 10. Por ejemplo, el sistema 5 puede incluir 50-100 de los canales 10 que están dispuestos en una configuración en paralelo. Usar una configuración en paralelo puede reducir las consecuencias de que se desarrolle una obstrucción en uno o más de los canales 10, y puede aumentar el rendimiento global del sistema 5. Adicionalmente, el sistema 5 puede incluir uno o más de los canales en serie entre sí.

En la etapa 1015, después de que las células 20 pasen a través del estrechamiento 15, se deja que las células se incuben/recuperen mediante reposo en el tampón 25 de disolución. Durante este tiempo, las células 20 captarán algunos de los materiales 30 de administración que están presentes en el tampón 25 de disolución a través de las perturbaciones en la membrana celular. Un mecanismo de captación se basa en difusión, porque moléculas más grandes parecen absorberse a una tasa más lenta que moléculas más pequeñas. Preferiblemente, se deja que las células 20 se incuben/recuperen en el tampón 25 de disolución durante el orden de 2-5 minutos, aunque son posibles otras duraciones. Durante el tiempo en el que las células 20 están incubándose/recuperándose en el tampón 25 de disolución, también puede liberarse material del interior de la célula 20 desde la célula al tampón 25 de disolución. Durante el periodo de incubación/recuperación, pueden controlarse determinadas condiciones para garantizar que las cantidades de administración de los materiales 30 de administración sean sistemáticas a lo largo de la población celular. Por ejemplo, pueden usarse mecanismos de administración por convección, tras el

estrechamiento, que hacen impactar material de administración sobre la célula en incubación/recuperación.

Opcionalmente, en la etapa 1020, después de haberse incubado/recuperado las células, pueden lavarse las células para eliminar el tampón de disolución. Preferiblemente, el lavado se produce tras el periodo de tiempo requerido para que se reparen las perturbaciones, aunque el lavado puede producirse en otros momentos con el fin de controlar la cantidad de materiales 30 de administración absorbidos por las células.

#### Ejemplo 1 - Administración de nanopartículas modificadas por ingeniería funcional

Los nanomateriales modificados por ingeniería tienen un enorme potencial como herramientas de obtención de imágenes de células vivas, agentes de administración moleculares terapéuticos o incluso como maneras para manipular células vivas con manipulaciones externas tales como luz o campos magnéticos. (Howarth, M., *et al.* Monovalent, reduced-size quantum dots for imaging receptors on living cells. *Nature Methods* 5, 397-399 (2008)). Sin embargo, muchas de estas posibles aplicaciones requieren que se administren nanomateriales en el citosol celular. La mayoría de las nanopartículas, tales como QD, necesitan pasivarse con un polímero que hace que las nanopartículas sean solubles en medios acuosos, y esto impide generalmente que difundan de manera pasiva a través de la membrana celular. Se considera que la microinyección de nanopartículas no es práctica debido al requisito de equipos especializados y al bajo rendimiento mientras que la electroporación provoca agregación de QD dentro de la célula. Por tanto, la mayoría de los intentos de administrar QD en el citoplasma celular se han basado en someter QD a endocitosis por la célula y escapar del endosoma. Antes del presente objeto, no era posible administrar QD en el citoplasma celular de una manera satisfactoria y ajustable a escala. El sistema proporciona una solución a este problema de administración de enfoques anteriores.

Se combina el dispositivo microfluídico con una nueva generación de QD biológicamente compatibles recientemente descritos (Liu, W., *et al.* Compact biocompatible quantum dots via RAFT-mediated synthesis of imidazole-based random copolymer ligand. *JACS* 132, 472-483 (2010)). Se recubrieron los QD usados a lo largo de la totalidad del ejemplo 1 con un ligando de poli-imidazol compuesto por múltiples grupos imidazol quelantes de metal y múltiples polietilenglicoles (PEG) pasivantes solubilizantes en agua.

Para la administración al citosol de QD, se añadieron alícuotas de células en una disolución de PBS que contenía QD. Se transfirió con pipeta la disolución de células-QD en el dispositivo microfluídico y se impulsó la disolución a través de los canales a presión constante, seguido por un periodo de incubación de 5 min. Tras este periodo de incubación, se separaron los QD en exceso mediante centrifugación. Para la población de control, se colocó la disolución de células-QD en el dispositivo microfluídico y se expusieron las células a la disolución de QD durante una cantidad de tiempo equivalente al protocolo de administración al citosol.

La figura 19 es una superposición de imágenes de transmisión y de fluorescencia confocal, seguido por imágenes de fluorescencia confocal en sección z de células tratadas a las que se les administró QD usando el presente objeto. La figura 19 ilustra (parte superior) inmediatamente después del tratamiento (es decir, administración) y (parte inferior) tras 48 h de incubación a 37°C y el 5% de CO<sub>2</sub>. El patrón de tinción difusa se restringe al citoplasma y las nanopartículas parecen no entrar en el núcleo (región oscura dentro de la célula). La barra de escala es de 10 μm. El ligando de poli-imidazol libre particular que recubrió los QD de los que se obtuvieron imágenes en la figura 19 no tenía ninguna funcionalidad aparte de proporcionar biocompatibilidad mediante grupos PEG. Las imágenes de microscopía confocal muestran que las células HeLa, desprendidas y redondas tras fluir a través del dispositivo microfluídico, tienen tinción con QD citoplásmica difusa a lo largo de diferentes secciones z de la célula (figura 19, parte superior). La tinción difusa persiste incluso después de 48 horas, tras la incubación y adherencia de las células a 37°C en el 5% de CO<sub>2</sub> (figura 19, parte inferior). La fluorescencia de QD difusa es más tenue a las 48 h, probablemente debido a la división celular (figura 19). El dispositivo administró QD (diámetro hidrodinámico de ~13 nm) en ~40% de la población de células vivas a una tasa de rendimiento de ~10.000 células/s. La figura 20A ilustra la eficiencia de administración en el citosol de células HeLa tras el tratamiento del presente objeto con QD recubiertos con PIL. La viabilidad celular era >80% tal como se midió mediante citometría de flujo. La figura 20B ilustra la viabilidad de células HeLa tras la administración de QD535 solo mediante el presente objeto, tal como se midió mediante tinción con yoduro de propidio y medición por citometría de flujo. La viabilidad de células tratadas tal como se midió mediante citometría de flujo, la tinción difusa en las imágenes confocales y la capacidad de la célula para adherirse son compatibles con la administración de QD en el citoplasma de una célula viva.

Para confirmar que la fluorescencia realmente aumenta a partir de los QD administrados al citosol en contraposición a los QD secuestrados en endosomas, se diseñó la nanopartícula para cambiar su perfil de emisión tras la interacción con el entorno reductor del citosol. El potencial de reducción dentro del citoplasma celular es de -260 a -220 mV y viene dictado principalmente por el mantenimiento de concentraciones altas (5-10 mM) del tripéptido glutatión. Por tanto, midiendo la fluorescencia de un constructo de QD-colorante cuya emisión cambia cuando se expone al entorno del citosol, puede determinarse la ubicación y la accesibilidad química de las nanopartículas administradas. Se construyó un QD-colorante que comprendía un QD de emisión verde ( $\lambda_{emisión} = 541 \text{ nm}$ ) que actúa como donador de energía para un colorante de carboxi-X-rodamina (Rox) ( $\lambda_{emisión} = 610 \text{ nm}$ ), conjugados a través de un enlace disulfuro reducible.

La figura 21 ilustra el diseño de constructo, la absorbancia y la estabilidad en diversos medios. En 2100 se encuentra un esquema del PIL antes de la conjugación con el colorante y el recubrimiento de los QD (izquierda) y del constructo de QD-disulfuro-Rox resultante (derecha) (imagen no a escala). En 2110 se encuentra el espectro de absorbancia del constructo de QD-disulfuro-colorante. La excitación a 488 nm y a 405 nm proporcionó absorción exclusiva mediante los QD a lo largo de todo el experimento. En 2120 se encuentra la estabilidad de transferencia de energía de fluorescencia desde QD hasta Rox para el constructo en medios de cultivo completos a 37°C y el 5% de CO<sub>2</sub>, demostrando que el enlace disulfuro no se escinde en el entorno extracelular. La representación gráfica 2130 ilustra la escisión del enlace disulfuro mediante el reductor citosólico glutatión, tal como se muestra mediante la recuperación de fluorescencia de QD. En 2140, se muestra la recuperación de fluorescencia de QD tras el tratamiento mediante el reductor distinto de tiol, tris(2-carboxietil)fosfina, respaldando adicionalmente la escisión del enlace disulfuro.

Los grupos tiol que se incorporaron en el PIL formaron enlaces disulfuro con colorantes de Rox tiolados. El espectro de absorbancia del constructo purificado tiene características de absorbancia tanto de QD como de Rox (2120) en un promedio de 13 colorantes de Rox por QD, extinguiendo eficazmente la fluorescencia de QD (2130). Este constructo sirve como sensor irreversible del entorno reductor específico en el citosol. Cuando el QD se excita selectivamente mediante un láser a 488 nm (microscopía) o 405 nm (citometría de flujo) mientras los puentes disulfuro están intactos, el constructo experimenta transferencia de energía de resonancia por fluorescencia (FRET) de modo que domina la emisión de Rox en el rojo. En un ensayo en disolución, el reductor celular glutatión escinde los puentes disulfuro, liberando colorantes de Rox y permitiendo que se recupere la fluorescencia de QD (2140). El reductor distinto de tiol, tris-(2-carboxietil)fosfina, también permite la recuperación de la fluorescencia de QD, indicando que la liberación de Rox de la superficie de QD no es mediante desplazamiento de PIL por glutatión (2140). La fluorescencia de Rox puede no desaparecer completamente debido a que algunos de los puentes disulfuro estén estéricamente impedidos mediante grupos PEG largos en el PIL, y debido a alguna pequeña cantidad de interacción no específica entre el colorante y la superficie de QD.

Cambios en el perfil de fluorescencia del constructo, tal como se midió mediante citometría de flujo y microscopía confocal, confirman la administración de constructos de QD-disulfuro-Rox al citoplasma celular. Cuando se expone al entorno reductor del citosol, la escisión de los enlaces disulfuro altera el procedimiento de FRET desde el QD hasta el colorante. Por tanto, tras la excitación exclusiva del QD, la fluorescencia de canal de QD aumenta mientras que la fluorescencia de canal de Rox disminuye con el tiempo. Se trataron células HeLa vivas mediante el dispositivo microfluídico en una disolución con una alta concentración de QD-disulfuro-Rox, se incubaron durante 5 minutos y se lavaron para retirar los QD en exceso antes de añadir medios de cultivo celular (es decir, las células tratadas). Se incubaron células de control con QD-disulfuro-Rox durante 5 minutos en vez de tratarse mediante el dispositivo microfluídico, y se lavaron antes de colocarse en medios de cultivo celular. La fluorescencia de canal de Rox y de QD de estas células tratadas y de control se observaron tanto mediante microscopía confocal como mediante citometría de flujo.

Las figuras 22A y 22B ilustran imágenes de microscopía confocal de células vivas y análisis de intensidad de fluorescencia que demuestran tinción citoplásmica y accesibilidad química de la superficie de QD. La figura 22A ilustra imágenes de células tratadas (parte superior) y células de control (parte inferior). La aparición de fluorescencia verde difusa sólo está presente en células tratadas. La barra de escala es de 10 µm. La figura 22B ilustra un cambio en la intensidad en función del tiempo en los canales verde y rojo. Dado que  $n < 20$  en cada punto de tiempo, se corrigieron fluctuaciones en la fluorescencia promedio total normalizando con respecto al punto de tiempo de 0 h.

En el microscopio confocal, la fluorescencia difusa que aparece a través del citoplasma de células tratadas avanza desde fuertemente roja hasta fuertemente verde (tal como se muestra en la figura 22A). Las imágenes de células de control muestran algo de unión no específica en la membrana exterior tal como se demuestra mediante la fluorescencia en forma de anillo, y no hay ningún aumento en las señales de canal verde. Estos efectos son compatibles con la escisión esperada de enlaces disulfuro citosólicos que reducen el efecto de FRET. En la figura 22B, el gráfico de líneas representa gráficamente la intensidad de canal de QD y de Rox por célula promedio tras corregir diferencias entre células en el material fluorescente administrado normalizando para la fluorescencia total, para células tratadas y de control y autofluorescencia. Para células tratadas, el gráfico muestra un cruce entre 2-4 horas de incubación en el que la fluorescencia de QD aumenta por encima de la fluorescencia de Rox. De manera interesante, se muestra que la señal de Rox de células tratadas se estabiliza por encima de los niveles de autofluorescencia tras 9 horas. Esto es compatible con resultados a partir de ensayos en disolución, en los que permaneció algo de FRET tras la reducción. La tinción difusa observada y el aumento en la señal de QD y la reducción en la señal de Rox respaldan fuertemente la administración al citosol y la posterior escisión de enlaces disulfuro. La fluorescencia de QD en células de control, extinguida mediante FRET para Rox, aparece indistinguible de la autofluorescencia. Las células de control presentan algo de fluorescencia de Rox por encima de la autofluorescencia en puntos de tiempo tempranos, que después disminuye de manera constante. Esto puede atribuirse a interacciones no específicas entre QD-S-S-Rox y la superficie de la célula, seguido por nueva solvatación de los constructos en el medio.

La figura 23 ilustra mediciones por citometría de flujo de viabilidad y fluorescencia celular promedio. En 2300 se

encuentra la fluorescencia de QD (izquierda) y Rox (derecha) por célula promedio, mostrando un aumento en la fluorescencia de QD únicamente en células tratadas. La fluorescencia de Rox en células tanto tratadas como de control está a niveles de autofluorescencia en el punto de tiempo de 24 h. En 2310 se encuentra un histograma de la distribución de intensidades de fluorescencia entre células tratadas y de control en puntos de tiempo seleccionados, en el canal de QD (izquierda) y el canal de Rox (derecha). Se estima que la administración de QD se ha producido en al menos el 35% de la población celular. Se pretende que las zonas en gris dirijan la vista en el movimiento de picos de histograma de intensidad de fluorescencia. En 2320 se ilustra la viabilidad de células de control y tratadas tal como se midió mediante yoduro de propidio.

Las mediciones por citometría de flujo ilustradas en la figura 23 confirman que los constructos de QD-disulfuro-Rox pueden interactuar con el entorno del citosol. Se registraron medidas de citometría de flujo en todas las células vivas, abarcando tanto células sometidas a administración (~35% de la población celular tratada) como no sometidas a administración. En 2100 se ilustra la fluorescencia por célula promedio de las poblaciones tratada y de control. La fluorescencia de QD promedio aumenta inicialmente para las células tratadas, alcanzando un pico a ~9 h y disminuyendo gradualmente después de eso, a diferencia de la fluorescencia de QD de la población celular de control, que permanece comparable a los niveles de autofluorescencia. Esto es compatible con la reducción en el citosol de puentes disulfuro entre QD y colorante dentro de las células tratadas seguido por dilución de constructos de fluorescencia mediante división celular. La fluorescencia de Rox para las células tanto tratadas como de control comienza alta y disminuye dentro del plazo de las primeras 2 h. Esta disminución se atribuye a la nueva solvatación en el medio de partículas que se habían unido a la superficie celular durante la incubación. La fluorescencia de Rox promedio en la población celular tratada parece similar a las células de control debido a la presencia de células no sometidas a administración dentro de la población tratada. La presencia de células tanto sometidas a administración como no sometidas a administración dentro de la población tratada puede distinguirse en los histogramas de intensidad de QD y de Rox mostrados en 2310. Al aumentar el tiempo, los histogramas de fluorescencia se vuelven bimodales para células tratadas pero permanecen unimodales para células de control. La fluorescencia de QD aumenta con el tiempo en un subconjunto de la población celular tratada (2100), respaldando adicionalmente la alteración del procedimiento de FRET en el citosol de células tratadas y sometidas a administración. La fluorescencia de Rox disminuye en conjunto a medida que vuelven a solvatare los constructos unidos a membrana en el medio, pero un subconjunto de la población celular tratada conserva fluorescencia de Rox. Esto es compatible con la reducción incompleta de enlaces QD-S-S-Rox observada en microscopía confocal. La viabilidad de la población celular tratada, tal como se midió mediante tinción con yoduro de propidio, está dentro del 10% de la población de control en todos los puntos de tiempo (2130). La viabilidad celular de >90% con respecto al grupo de control se compara de manera favorable con métodos alternativos tales como electroporación y métodos basados en polímeros, que han proporcionado viabilidades posteriores al tratamiento de tan sólo el 40 - 60%.

La figura 24 ilustra la obtención de imágenes por epifluorescencia de QD individuales sin agregar dentro del citosol celular tras el tratamiento con dispositivo con una disolución de QD 10 nM (parte superior), y perfiles de parpadeo de los tres QD marcados 2400, 2410 y 2420 con autofluorescencia. Los perfiles de parpadeo de QD parecen ser no binarios debido a los tiempos de intervalo de adquisición prolongados (500 ms). Las barras de escala son de 10  $\mu\text{m}$ .

La plataforma de administración de QD también permitió obtener imágenes de moléculas individuales administrando constructos de QD-disulfuro-Rox sin agregar, dado que la intermitencia de emisión observada es compatible con QD individuales. Para este experimento, se administraron constructos de QD-disulfuro-Rox en el citosol seguido por una incubación de 10 horas y se obtuvieron imágenes en un microscopio de epifluorescencia. La incubación de 10 horas garantizó que la fluorescencia de QD del interior del citosol se había recuperado mediante reducción de enlaces disulfuro; se usó microscopía de epifluorescencia para garantizar que se recopilaban suficientes fotones. Se observaron varios QD parpadeantes cuando se trataron células mediante el presente objeto a bajas concentraciones de QD (figura 24). Los perfiles de intensidad de QD parpadeantes en el citosol, mostrados en 2400, 2410 y 2420, parecen no binarios como resultado de tiempos de intervalo de adquisición prolongados (500 ms). Se consideró que los movimientos celulares de traslación eran mínimos durante el intervalo de tiempo de la adquisición (~1 min). Estos datos demuestran la capacidad de observar acontecimientos de moléculas individuales dentro del citosol celular mediante administración de QD como marcadores fluorescentes usando el presente objeto.

El ejemplo 1 demuestra la administración de nanopartículas en el citosol celular según una realización del presente objeto. Observando la escisión de QD-disulfuro-Rox mediante reductores citosólicos, se ha mostrado que la superficie de nanopartículas interactúa con componentes del citosol. Realizaciones del presente objeto permiten la administración de QD en el citoplasma celular a un alto rendimiento sin que ningún ligando penetre en la célula o escape del endosoma, al tiempo que se conservan la viabilidad celular y la integridad de QD. La eficiencia de administración del 35% puede aumentarse adicionalmente aumentando el número de estrechamientos microfluídicos, cambiando las dimensiones de estrechamiento o aumentando el número de ciclos de tratamiento. A diferencia de la mayoría de los métodos de administración actuales asistidos por carga positiva o de péptidos que penetran en células, el presente objeto no requiere la conjugación doble de una manipulación de administración intracelular y una manipulación de direccionamiento de proteínas al citosol en la misma nanopartícula. Eliminando la necesidad de la primera, puede lograrse la mitigación de las preocupaciones de reactividad cruzada, eficiencias de reactividad diferentes de estrategias de conjugación y estequiometría de conjugación. Por tanto, se obtiene una flexibilidad significativa en el diseño de constructos de QD, preparando el camino para el marcaje y el seguimiento

de proteínas intracelulares. Los métodos son útiles para la administración de muchos nanomateriales fluorescentes con diseños complejos que seleccionan como diana proteínas intracelulares y orgánulos mediante estrategias de selección de proteínas como diana demostradas tales como, pero sin limitarse a, estreptavidina-biotina, HaloTag-cloroalcano y marcaje con etiqueta de sortasa.

5 En el ejemplo 1, todos los productos químicos se obtuvieron de Sigma Aldrich y se usaron tal como se recibieron a menos que se indique lo contrario. Se manipularon materiales sensibles al aire en una caja de guantes Omni-Lab VAC en una atmósfera de nitrógeno seco con niveles de oxígeno < 0,2 ppm. Todos los disolventes eran para espectroscopía o reactivos. Se visualizaron compuestos que portaban anillos aromáticos en CCF usando una lámpara de UV portátil y  $\text{KMnO}_4$ . Se visualizaron compuestos que portaban amina en CCF usando una tinción con ninhidrina. Se realizó cromatografía en columna ultrarrápida en un dispositivo Teledyne Isco Combi Flash Companion. Se adquirieron células HeLa de ATCC y todos los materiales de medio celular se adquirieron de Mediatech a menos que se indique lo contrario.

15 En el ejemplo 1, se registraron espectros de  $^1\text{H}$ -RMN en un espectrómetro de RMN Bruker DRX 401. Se realizó EM-ESI en una máquina Bruker Daltonics APEXIV 4.7 FT-ICRMS. Se tomaron espectros de absorbancia UV-Vis usando un espectrofotómetro de matriz de diodos HP 8453. Se registraron espectros de fotoluminiscencia y absorbancia con un lector de microplacas BioTek Synergy 4. Se determinaron los pesos moleculares de polímeros en disolución de DMF en un sistema de HPLC/GPC serie 1100 de Agilent con tres columnas de PLgel (103, 104, 105 Å) en serie frente a patrones de poliestireno estrechos. Se purificaron derivados de colorantes usando un sistema de HPLC preparativa Varian ProStar. Se purificó polímero modificado usando columnas PD-10 de GE Healthcare empaquetadas con Sephadex<sup>TM</sup> G-25M. Se purificaron QD sometidos a intercambio de ligando mediante diálisis por centrifugación con filtros de centrifugación con un punto de corte de 30 K Millipore Amicon Ultra y mediante GFC en un sistema de cromatografía AKTAprime Plus (Amersham Biosciences) equipado con una columna de vidrio Superdex 200 10/100 autoempaquetada. Se realizaron mediciones de citometría de flujo en un dispositivo LSR Fortessa (BD Biosciences).

30 En el ejemplo 1, se sintetizaron núcleos de CdSe con un primer pico de absorción a 478 nm usando un método (1) anteriormente notificado. En resumen, se colocaron 0,4 mmol (54,1 mg) de CdO, 0,8 mmol (0,2232 g) de TDPA, 9,6 mmol (3,72 g) de TOPO en un matraz de fondo redondo de 25 ml. Se desgasificó la disolución durante 1 h a 160°C y se calentó hasta 300°C en argón hasta que se disolvió el CdO y se formó una disolución homogénea. Esto fue seguido por poner la disolución a vacío a 160°C para eliminar el agua desprendida. Volvió a calentarse la disolución hasta 360°C en argón y se añadió rápidamente una disolución de TOP-Se (1,5 ml de TOPSe 1,5 M en 1,5 ml de TOP) para dar núcleos de CdSe con la primera característica de absorción a 478 nm.

35 Se depositaron cubiertas de CdS sobre núcleos de CdSe mediante modificación de procedimientos (2) anteriormente notificados. Núcleos aislados mediante precipitaciones repetidas en hexano con acetona se llevaron hasta 180°C en una mezcla de disolventes de oleilamina (3 ml) y octadeceno (6 ml). Después se introdujeron de manera continua disoluciones de precursores de Cd y S a una tasa de 4 ml/h. El precursor de Cd consistía en 0,33 mmol de oleato de Cd y 0,66 mmol de oleilamina en una mezcla de disolventes de octadeceno (1,5 ml) y TOP (3 ml). El precursor de S consistía de 0,3 mmol de hexametildisililano  $[(\text{TMS})_2\text{S}]$  en 6 ml de TOP. La adición de un total de 3 monocapas de cada uno de Cd y S proporcionó QD con emisión a 541 nm y un rendimiento cuántico del 60% cuando se diluyeron en octano. El coeficiente de extinción de CdSe(CdS) se calculó usando el coeficiente de extinción de núcleos de CdSe a partir de la bibliografía (3) y suponiendo que el 95% de los núcleos de CdSe se conservaban durante la etapa de recubrimiento.

50 En el ejemplo 1, se fabricó el chip de silicio usando técnicas de fotolitografía y grabado químico profundo por iones reactivos. Se limpió la oblea de silicio grabada químicamente resultante (con  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) para eliminar residuos, se oxidó para producir una superficie de vidrio y se unió a una oblea de Pyrex antes de cortarse para dar dispositivos empaquetados individualmente. Después se inspeccionó individualmente cada dispositivo para detectar defectos antes de su uso.

#### Ejemplo 2 - Administración de macromoléculas

55 La administración intracelular de macromoléculas es una etapa crítica en aplicaciones terapéuticas y de investigación. La administración mediada por nanopartículas de ADN y ARN, por ejemplo, es útil para la terapia génica, mientras que la administración de proteínas está usándose para afectar a la función celular en entornos tanto clínicos como de laboratorio. Otros materiales, tales como moléculas pequeñas, puntos cuánticos o nanopartículas de oro, se administran al citosol con fines que varían desde terapias contra el cáncer hasta marcaje intracelular y seguimiento de moléculas individuales.

65 Para demostrar la versatilidad de la técnica, se administraron moléculas de dextrano de modelo a varios tipos de células: células dendríticas DC2.4, fibroblastos de prepucio humanos de recién nacido (NuFF) y células madre embrionarias de ratón (mESC), que lograron eficiencias de administración de hasta el 55%, el 65% y el 30%, respectivamente. Experimentos iniciales también mostraron la administración satisfactoria en linfocitos primarios, macrófagos y células dendríticas derivadas de ratones. Además, la técnica no provocó citotoxicidad excesiva ni

indujo diferenciación de células madre. De hecho, todos los tipos de células eran viables a más del 60% incluso a las velocidades más altas sometidas a prueba. El diseño del dispositivo y las condiciones de funcionamiento no se habían optimizado previamente para ninguno de los tipos de células anteriormente mencionados.

5 La figura 25 ilustra resultados experimentales que muestran que el rendimiento de la administración depende de la velocidad celular y el diseño de estrechamiento. Las dimensiones de estrechamiento se indican mediante números (por ejemplo 10  $\mu\text{m}$  - 6  $\mu\text{m}$  x 5) de tal manera que el primer número corresponde a la longitud de estrechamiento, el segundo a la anchura de estrechamiento y el tercero (si está presente) al número de estrechamientos en serie por canal. En 2500, se muestra la eficiencia de administración y en 2510 se muestra la viabilidad celular 18 horas tras el tratamiento (medida mediante citometría de flujo) en función de la velocidad celular para diseños de dispositivo de 10  $\mu\text{m}$  - 6  $\mu\text{m}$  x 5 ( $\Delta$ ). En 2520, se muestra la eficiencia de administración y en 2530 la viabilidad celular (medida mediante citometría de flujo) en función de la velocidad en fibroblastos humanos primarios ( $\square$ ), células dendríticas DC2.4 ( $\circ$ ) y células madre embrionarias de ratón (mESC) ( $\Delta$ ) tratadas mediante un dispositivo de 30  $\mu\text{m}$  - 6  $\mu\text{m}$ . Se analizaron fibroblastos humanos y células dendríticas 18 horas tras la administración. Se analizaron mESC 1 hora tras la administración. Todos los puntos de datos se realizaron por triplicado y las barras de error representan dos desviaciones estándar.

La figura 26 ilustra exploraciones 2600 de diferentes planos horizontales de una célula HeLa tras la administración de dextrano de 3 kDa conjugado con azul pacífico, tal como se midió mediante microscopía confocal. Las exploraciones se leen desde arriba hacia abajo, después de izquierda a derecha, en las que la parte izquierda superior está a  $z = 6,98 \mu\text{m}$  y la parte derecha inferior está a  $z = -6,7 \mu\text{m}$ . La barra de escala representa 6  $\mu\text{m}$ . En 2610, se muestra la eficiencia de administración a células vivas de dispositivos de 10  $\mu\text{m}$  - 6  $\mu\text{m}$  ( $\square$ ), 20  $\mu\text{m}$  - 6  $\mu\text{m}$  ( $\circ$ ), 30  $\mu\text{m}$  - 6  $\mu\text{m}$  ( $\Delta$ ) y 40  $\mu\text{m}$  - 6  $\mu\text{m}$  ( $\diamond$ ). El eje de tiempo indica la cantidad de tiempo transcurrido desde el tratamiento inicial de células antes de exponerse a la disolución de administración objetivo. Todos los resultados se midieron mediante citometría de flujo 18 horas tras el tratamiento. En 2620, intensidad promedio de la población celular sometida a administración normalizada mediante células sin tratar para control para la autofluorescencia. Se administran dextrano de 70 kDa conjugado con fluoresceína (líneas horizontales) y dextrano de 3 kDa conjugado con azul pacífico (líneas diagonales) a la célula (ciclos 1 y 3) y se retiran de la célula (ciclo 2) en ciclos de tratamiento consecutivos. El control representa células que sólo se expusieron a la disolución de administración y no se trataron mediante el dispositivo. Todos los puntos de datos se realizaron por triplicado y las barras de error representan dos desviaciones estándar.

Dado que las técnicas anteriores basadas en nanopartículas y péptidos que penetran en células (CPP) aprovechan rutas endocitóticas, se presentan evidencias que descartan la influencia de la endocitosis en el mecanismo de administración del presente objeto. La figura 26 ilustra en 2600 la microscopía confocal de células tratadas con dextrano de 3 kDa conjugado con azul pacífico que demuestra tinción citosólica difusa en contraposición a la característica punteada que se esperaría de métodos endocitóticos. Además, cuando se llevan a cabo experimentos de administración a 4°C, una temperatura a la que se minimiza la endocitosis, la eficiencia de administración se ve mínimamente afectada por la temperatura para ambos materiales de carga útil de prueba, dextrano de 3 kDa y de 70 kDa. Estos datos indican que es poco probable que la endocitosis sea responsable de la administración en este sistema.

Se caracterizó la cinética de administración a lo largo del tiempo. Se trataron células mediante el presente objeto en ausencia de material de administración y posteriormente se expusieron a dextrano de 3 kDa marcado con azul pacífico a intervalos de tiempo definidos tras el tratamiento. En este enfoque, a medida que las células pasan a través del estrechamiento se altera su membrana; sin embargo, no se produce ninguna administración medible hasta que se exponen al dextrano marcado. Por tanto, la eficiencia de administración en cada punto de tiempo reflejará la proporción de células que permanecían porosas durante esa cantidad de tiempo tras el tratamiento. Este método captura la cinética de la formación/cierre de poros. Los resultados indican que casi el 90% de la administración se produce dentro del primer minuto tras el tratamiento independientemente del diseño de dispositivo (2610). La escala de tiempo observada respalda la hipótesis de formación de poros ya que trabajos anteriores sobre la cinética de reparación de membrana han notificado que el sellado de membrana se produce a aproximadamente 30 s tras inducirse una lesión. En cambio, la escala de tiempo recomendada para métodos endocitóticos tales como mecanismos de administración mediados por nanopartículas y CPP es del orden de horas.

Dado que la administración de material a través de los poros de membrana es por difusión, puede intercambiarse material al interior y al exterior de la célula a lo largo de toda la vida útil del poro. Por otro lado, los mecanismos endocitóticos o por convección deben ser unidireccionales, es decir, sólo facilitan el transporte de material en la célula. Para demostrar el transporte bidireccional de material a través de la membrana celular, se llevó a cabo un experimento que consistía en 3 ciclos de administración. En el primer ciclo, se trataron células en presencia de dextrano de 3 kDa y de 70 kDa, se incubaron durante 5 min en la disolución de dextrano y se lavaron dos veces con PBS. Se conservó un tercio de la muestra y se sembró en placa para su seguimiento. En el segundo ciclo, se trataron de nuevo las células lavadas restantes mediante el dispositivo pero en ausencia de cualquier material de administración y se incubaron durante otros 5 min. La mitad de esta muestra se sembró en placa para su seguimiento. En el tercer ciclo, se hicieron pasar las células restantes del segundo ciclo a través del dispositivo en

las mismas condiciones que el primer ciclo (es decir, en presencia de dextrano), se incubaron durante 5 minutos y se lavaron dos veces en PBS. Se analizaron las células mediante citometría de flujo 18 horas tras el experimento. Los cambios en la intensidad de fluorescencia normalizada demuestran una difusión neta de dextrano en las células durante el primer ciclo, fuera de las células durante el segundo y de vuelta al interior durante el tercero (2620). Por tanto, estos resultados son compatibles con el mecanismo de administración por difusión.

La figura 27 ilustra un modelo de difusión en 2D simplificado desarrollado en un paquete de software conocido como COMSOL Multiphysics que simula la difusión pasiva de material en una célula a través de una membrana sometida a poración. COMSOL Multiphysics es un paquete de software de análisis de elementos finitos, resolución y software de simulación / FEA desarrollado por COMSOL para diversas aplicaciones de física e ingeniería, especialmente fenómenos acoplados, o multifísica. En 2700, se muestra la administración/pérdida de material en función de la difusividad de membrana. Los resultados de simulación indican el porcentaje de material administrado/perdido de la célula en función de la difusividad de membrana cuando el material de interés está en el tampón (□) o en la célula (○) en el momento de la poración. En 2710 se encuentra una representación gráfica del sistema simulado y el gradiente de concentración que se forma a través de la membrana si se administra material desde el tampón hasta la célula.

Usando valores de la bibliografía para difusividades de partícula dentro y fuera del citoplasma celular, se recrearon cualitativamente los resultados experimentales de la figura 26 con difusión como único modo de transferencia de masa. Además, ajustando los datos experimentales a este modelo, esta técnica administra el 10-40% del material de administración en el tampón al interior del citosol celular. En comparación, se estima que los métodos de CPP para administración de proteínas sólo administran el 0,1% del material de tampón al citosol.

El tamaño de una partícula (o radio hidrodinámico) afecta a su difusividad y a su capacidad para entrar en los poros de membrana de un tamaño particular. Por tanto, este parámetro afecta a la eficiencia de administración en el mecanismo de formación de poros/difusión. En una serie de experimentos, se administraron cargas útiles de prueba de dextranos de 3 kDa, 10 kDa, 70 kDa, 500 kDa y 2 MDa conjugados con fluoresceína o azul pacífico. También se administraron plásmidos marcados con fluoresceína que se estimaba que tenían 3,1 MDa. Estas moléculas de modelo se seleccionaron basándose en su similitud en cuanto al peso molecular con respecto a materiales de administración de interés. Por ejemplo, los dextranos de 3 kDa - 10 kDa tienen un tamaño similar a algunos péptidos cortos o ARNip, mientras que el intervalo de 70 kDa - 2 MDa imita el tamaño de la mayoría de las proteínas y algunas nanopartículas pequeñas.

La figura 28 ilustra resultados de una administración en dos niveles de material. En 2800, se muestra la eficiencia de administración a células vivas, en función de la velocidad, para células HeLa tratadas con dextrano de 3 kDa conjugado con azul pacífico (□), de 70 kDa conjugado con fluoresceína (○) y de 2 MDa (A). Este experimento se llevó a cabo con un chip de 10  $\mu\text{m}$  - 6  $\mu\text{m}$  x 5. Todos los puntos de datos se realizaron por triplicado y las barras de error representan dos desviaciones estándar. 2810 y 2820 ilustran superposiciones de histogramas de datos de citometría de flujo para células HeLa que no se trataron (rojo), tratadas a 700 mm/s (verde), tratadas a 500 mm/s (naranja), tratadas a 300 mm/s (azul claro) o sólo expuestas al material de administración (control, azul oscuro). El material de administración consistió en dextrano de 3 kDa conjugado con azul pacífico (2810) y dextrano de 70 kDa conjugado con fluoresceína (2820).

Los experimentos han mostrado que moléculas mayores de 70 kDa tienen un perfil de administración diferente con respecto a dextrano de 3 kDa (2800). El dispositivo produjo una administración en dos niveles en la que un dispositivo de 10  $\mu\text{m}$  - 6  $\mu\text{m}$  x 5 que se hace funcionar a 500 mm/s, por ejemplo, permite que más del 90% de células vivas reciban las moléculas de 3 kDa, mientras que aproximadamente el 50% reciben las moléculas de 70 kDa y 2 MDa más grandes.

Los histogramas correspondientes a estos datos de citometría de flujo indican que la administración de dextrano de 3 kDa produce dos picos diferenciados (2810). En la primera subpoblación, las células muestran niveles de administración leves tal como se observa mediante un desplazamiento de pico con respecto a controles (los controles representan la endocitosis y la unión a superficie tal como se describió anteriormente para los puntos de datos de 0 mm/s) con un aumento de 2-6 veces en la intensidad de fluorescencia promedio. En la segunda población, las células muestran niveles de administración potenciados correspondientes a un aumento de 20-100 veces en la intensidad de fluorescencia promedio con respecto a controles. Este efecto puede indicar que esta última subpoblación de células se sometió a una poración más intensa que la primera, permitiendo de ese modo un aumento de casi 10 veces en el flujo de entrada de material. De hecho, tal como se ilustra mediante las curvas de 300 mm/s, 500 mm/s y 700 mm/s, al aumentar la intensidad de tratamiento, aumentando las velocidades de funcionamiento, parece aumentar la proporción de células con administración potenciada. Se observa una característica similar para la administración de moléculas de dextrano de 70 kDa más grandes (2820). Sin embargo, el efecto es menos pronunciado, ya que la difusividad de partículas inferior y posibles efectos de exclusión molecular reducen la cantidad global administrada. La población de administración leve (primer pico) sólo muestra un aumento de 1,5-2 veces en la intensidad fluorescente promedio en comparación con las 2-6 veces observadas en el caso de 3 kDa. Este efecto puede explicar la discrepancia en los datos de administración en 2800 ya que en el caso de moléculas más grandes puede ser difícil distinguir la población de administración leve con respecto a controles

basándose en la presente definición de administración. Como resultado, para moléculas más grandes, tales como el dextrano de 70 kDa y 2 MDa, se mide en gran medida la segunda población de administración potenciada.

Para verificar que el material administrado mediante deformación mecánica rápida es activo y está biológicamente disponible en el citosol celular, se llevó a cabo una serie de experimentos administrando carga útil de prueba, ARNip de silenciamiento de GFP (Ambion, EE.UU.), a células HeLa que expresaban GFP desestabilizada. Se observó silenciamiento de GFP dependiente de la dosis y específico de secuencia (hasta el 80%) a las 18 horas tras el tratamiento. La resistencia de silenciamiento génico frente a la velocidad celular y el diseño de dispositivo fueron compatibles con experimentos de administración de dextrano, de tal manera que velocidades superiores y diseños de múltiples estrechamientos proporcionaron un mayor silenciamiento génico. Se usó Lipofectamine 2000 como control positivo en estos experimentos. El diseño de dispositivo y los parámetros de funcionamiento no se optimizaron para la administración de ARNip antes de realizar estos experimentos.

La figura 29 ilustra datos referentes a la administración de ARNip, proteínas y nanopartículas. En 2900, se ilustra el silenciamiento génico en función del tipo de dispositivo y la velocidad celular, en células HeLa que expresan GFP desestabilizada 18 horas tras la administración de ARNip anti-eGFP usando un chip de  $10\ \mu\text{m} - 6\ \mu\text{m} \times 5$  a una concentración de administración de  $5\ \mu\text{M}$ . Se usó Lipofectamine 2000 como control positivo. En 2910, se muestra la eficiencia de administración de dextrano de 70 kDa marcado con fluoresceína y de 3 kDa marcado con azul pacífico mediante deformación mecánica rápida y electroporación. Cada tipo de dextrano estaba a una concentración de  $0,1\ \text{mg/ml}$  en la disolución de administración. En 2920, se muestran la eficiencia de administración de albúmina sérica bovina marcada con fluoresceína ( $\circ$ ), la eficiencia de administración de dextrano de 3 kDa conjugado con azul pacífico ( $\square$ ) y la viabilidad celular ( $\Delta$ ), en función de la velocidad, usando un dispositivo de  $30\ \mu\text{m} - 6\ \mu\text{m}$ . En 2930, se muestran microfotografías fluorescentes de células HeLa inmediatamente después de la administración de anticuerpos frente a tubulina con una etiqueta de Alexa Fluor 488. Barras de escala a  $5\ \mu\text{m}$ . En 2940 y 2950 se muestran imágenes de microscopía electrónica de efecto túnel (TEM) de nanopartículas de oro (algunas indicadas mediante flechas) en células fijadas  $\sim 1\ \text{s}$  tras el tratamiento mediante un dispositivo de  $10\ \mu\text{m} - 6\ \mu\text{m} \times 5$ . Barras de escala a  $500\ \text{nm}$ . Todos los puntos de datos se realizaron por triplicado y las barras de error representan dos desviaciones estándar.

En experimentos adicionales, se explora el potencial de administración al citosol para aplicaciones anteriormente desafiantes, tales como administración de proteínas y nanopartículas. Para comparar el rendimiento del presente objeto con métodos comercialmente disponibles, se administró dextrano de 3 kDa y de 70 kDa, como modelo de proteína, a fibroblastos humanos usando el presente objeto y un sistema de electroporación Neon (Invitrogen). Los resultados indican que la deformación mecánica rápida proporciona un aumento de 7 veces o más en la eficiencia de administración para tales macromoléculas (2910). Para trasladar el método a la administración de proteínas, se usó un dispositivo de  $30\ \mu\text{m} - 6\ \mu\text{m}$  de diámetro de canal para administrar albúmina sérica bovina (BSA) marcada con fluoresceína a células HeLa a una eficiencia de hasta el 44% mientras se mantenían viabilidades por encima del 90% (2920). También se administraron anticuerpos frente a tubulina marcados con Alexa Fluor 488 (BioLegend) a células HeLa tras el tratamiento con un dispositivo de  $30\ \mu\text{m} - 6\ \mu\text{m}$  usando una concentración de anticuerpo de  $0,25\ \text{mg/ml}$  (2930). La tinción difusa indica que el material no está atrapado en endosomas y, por tanto, es adecuado para la tinción con anticuerpos de células vivas de estructuras celulares en el citosol. También se administró satisfactoriamente apolipoproteína E usando esta técnica.

Para la administración de nanopartículas, imágenes de TEM de células fijadas  $\sim 1\ \text{s}$  tras la deformación (2940 y 2950) demuestran la administración de nanopartículas de oro de  $15\ \text{nm}$  recubiertas con PEG1000. Las nanopartículas de oro parecen estar principalmente no agregadas y no se secuestraron de manera visible en endosomas. En estas imágenes, se observaron evidencias de diversos defectos en el citoplasma celular responsables de la administración. Se ha demostrado un alto rendimiento, administración no citotóxica de puntos cuánticos directamente al citosol celular (un objetivo que técnicas anteriores se han esforzado por lograr). En estos experimentos, se administraron puntos cuánticos con un colorante Rox unido a su superficie mediante deformación mecánica rápida y se observaron a lo largo del tiempo. Estos datos proporcionaron una eficiencia de administración estimada mínima del 35% y confirmaron que los puntos cuánticos administrados estaban en el citosol y químicamente accesibles para el entorno intracelular.

Se forman poros transitorios mediante deformación mecánica rápida de una célula a medida que pasa a través de un estrechamiento microfluídico. Los datos respaldan este mecanismo demostrando una tinción citosólica difusa (figura 26 en 2600), funcionalidad de ARNip (figura 29 en 2900) y el movimiento bidireccional de material a través de la membrana sometida a poración (figura 26 en 2920). Se han identificado varios parámetros, tales como dimensiones de estrechamiento, número de estrechamientos en serie y velocidad celular, que afectan a la eficiencia de administración y viabilidad (figura 25). Por tanto, pueden usarse estos parámetros para optimizar el diseño de dispositivo para aplicaciones individuales basándose en el tipo de célula y el tamaño del material de administración.

En el ejemplo 2, esta técnica se basa en el sistema microfluídico, que puede incorporarse en un sistema integrado más grande que consiste en múltiples etapas previas al tratamiento antes de la administración y etapas analíticas o de clasificación posteriores al tratamiento. A una tasa de rendimiento promedio de  $10.000\ \text{células/s}$ , el dispositivo de

administración puede colocarse, por ejemplo, en línea con una máquina de citometría de flujo para clasificar células o realizar otras tareas analíticas inmediatamente después de la administración.

Los dispositivos, sistemas y métodos descritos en el presente documento proporcionan un número de 30 ventajas posibles con respecto a métodos existentes. De manera similar a la electroporación y la microinyección, es un mecanismo basado en poración y, por tanto, no se basa en materiales exógenos, modificación química de cargas útiles o rutas endocitósicas. Sin embargo, a diferencia de la electroporación, no se basa en campos eléctricos que tienen un éxito limitado en la administración de proteínas, puede dañar alguna carga útil o provocar citotoxicidad. De hecho, los presentes resultados han demostrado una viabilidad relativamente alta en la mayoría de las aplicaciones y cargas útiles sensibles, tales como puntos cuánticos, que parecen no dañarse. Por tanto, el presente objeto proporciona ventajas significativas en áreas tales como el marcaje y seguimiento de material citosólico en las que el daño de puntos cuánticos debido a electroporación puede ser un problema y el uso de métodos de administración químicos puede restringir la gama de químicas de superficie disponibles.

El ejemplo 2 también ha demostrado la capacidad del dispositivo para administrar proteínas al citosol celular. Los datos y las estimaciones de modelado indican que el presente objeto puede administrar 10-100 veces más material por célula con respecto a prácticas anteriores, tales como el uso de electroporación o péptidos que penetran en células. Esta mejora en las tasas de administración proporciona un método potente para su uso en reprogramación celular basada en proteínas, por ejemplo, en la que la administración de factores de transcripción al citosol celular es un obstáculo principal para desarrollar métodos fiables de generación de iPSC. También puede usarse el presente objeto para estudiar el mecanismo de enfermedad mediante la administración de diversas proteínas/péptidos de interés. De hecho, el presente objeto puede usarse para el examen de alto rendimiento de bibliotecas de péptidos porque, a diferencia de la mayoría de las técnicas basadas en CPP o nanopartículas, el presente objeto es insensible a la química y estructura de proteínas, no se basa en rutas endocitósicas y no afecta a la funcionalidad de proteínas.

Dado que el presente objeto ha demostrado el potencial para administración a células primarias, la administración al citosol mediante deformación mecánica rápida puede implementarse como un mecanismo de tratamiento *ex vivo*. En este enfoque, las células diana del paciente, aisladas a partir de la sangre u otro tejido, se tratan mediante el dispositivo fuera del cuerpo del paciente y después vuelven a introducirse en el cuerpo. Un enfoque de este tipo aprovecha la eficiencia de administración aumentada de productos terapéuticos de proteínas o nanopartículas y es más seguro que las técnicas existentes porque elimina la necesidad de partículas de vector potencialmente tóxicas y mitiga cualquier posible efecto secundario asociado con el aclaramiento reticuloendotelial y la administración fuera de la diana.

En el ejemplo 2, los dispositivos basados en silicio se fabricaron en una instalación de microfabricación usando técnicas de fotolitografía y grabado químico profundo por iones reactivos. En este procedimiento, se tratan obleas de silicio de 6" con un grosor de 450  $\mu\text{m}$  con hexametildisilazano (HMDS), se recubren por centrifugación con material fotosensible (OCG934, FujiFilm) durante 60 s a 3000 rpm, se exponen a luz UV (EV1-EVG) a través de una máscara cromática con el diseño de canal de estrechamiento y se revelan en disolución de AZ405 (AZ Electronic Materials) durante 100 s. Tras 20 min de cocción a 90°C, se grabó químicamente la oblea mediante grabado químico profundo por iones reactivos (SPTS Technologies) hasta la profundidad deseada (normalmente, en este ejemplo, 15  $\mu\text{m}$ ). Se usó un tratamiento de tipo piraña ( $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) para eliminar cualquier material fotosensible restante tras completarse el procedimiento de grabado químico. Para grabar químicamente los orificios de acceso (es decir, entrada y salida) se repitió el procedimiento en el lado opuesto de la oblea (es decir, el que no contenía los canales grabados químicamente) usando una máscara diferente, que contiene los patrones de orificios de acceso y un material fotosensible más grueso, AZ9260 (AZ Electronic Materials).

Se usó limpieza con plasma de oxígeno y RCA para eliminar cualquier impureza restante. Se usó oxidación en húmedo para hacer crecer 100-200 nm de óxido de silicio antes de unir la oblea de manera anódica a una oblea de Pyrex y se cortó para dar dispositivos individuales. Se inspeccionó individualmente cada dispositivo para detectar defectos antes de su uso.

Antes de cada experimento, se montaron dispositivos sobre un soporte con depósitos de entrada y salida (todos diseñados de manera personalizada y producidos por Firstcut). Estos depósitos se interconectan con el dispositivo usando juntas tóricas de Buna-N (Mc-Master-Carr) para proporcionar un sellado apropiado. El depósito de entrada se conecta a un sistema regulador de presión usando tubos de Teflon para proporcionar la fuerza motriz necesaria para empujar material a través del dispositivo. El ejemplo 2 puede adaptarse a presiones de hasta 4.826 bar (70 psi).

El cultivo celular del ejemplo 2 incluyó células HeLa (ATCC), HeLa que expresaban GFP y DC2.4 (ATCC) que se cultivaron en medio esencial modificado por Dubelco de alto contenido en glucosa (DMEM, Mediatech) complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10% (Atlanta Biologicals) y penicilina-estreptomina al 1% (Mediatech). Se cultivaron células de fibroblastos humanos primarios (NuFF) (Globalstem) en DMEM de alto contenido en glucosa complementado con FBS al 15%. Se mantuvieron las células en una incubadora a 37°C y el 5% de  $\text{CO}_2$ . Cuando era aplicable, se suspendieron células adherentes mediante tratamiento con tripsina al 0,05%/EDTA (Mediatech) durante 5-10 min.

5 Se hicieron crecer células madre embrionarias de ratón (mESC) en fibroblastos embrionarios de ratón (Chemicon) en medios que consistían en el 85% de DMEM desactivado, el 15% de suero bovino fetal, glutamina 1 mM, beta-mercaptoetanol 0,1 mM y el 1% de aminoácidos no esenciales suplantados por 1000 unidades/ml de LIF (Millipore, EE.UU.). Se sometieron las células a pase cada 2-3 días usando tripsina al 0,25%/EDTA. Cuando se trataron con el dispositivo, las mESC eran capaces de volver a formar colonias y conservaban una morfología normal incluso 2 semanas después del tratamiento.

10 Para realizar un experimento para el ejemplo 2, en primer lugar se suspendieron células en el tampón de administración deseado (medio de crecimiento, solución salina tamponada con fosfato (PBS) o PBS complementada con FBS al 3% y F-68 Pluronic al 1% (Sigma)), se mezclaron con el material de administración deseado y se colocaron en el depósito de entrada del dispositivo. Este depósito se conecta a una línea de aire comprimido controlada mediante un regulador y se usó la presión seleccionada (0-4.826 bar (0-70 psi)) para impulsar el fluido a través del dispositivo. Después se recogen células tratadas a partir del depósito de salida. Se incubaron las células a temperatura ambiente en la disolución de administración durante 5-20 min tras el tratamiento para garantizar el cierre de poros antes de someterse a ningún tratamiento adicional.

20 En los experimentos del ejemplo 2 que comparaban la administración de dextranos de diferente tamaño o proteína frente a dextrano, se administraron conjuntamente las moléculas de interés, es decir, se usaron en el mismo experimento, con la misma población celular, en el mismo dispositivo y se diferenciaron basándose en sus marcadores fluorescentes. Todas las condiciones de experimentación se llevaron a cabo por triplicado y las barras de error representan dos desviaciones estándar.

25 Para administrar moléculas de dextrano marcadas de manera fluorescente (Invitrogen) o apolipoproteína E (Invitrogen), los experimentos del ejemplo 2 se llevaron a cabo tal como se describió anteriormente de tal manera que el tampón de administración contenía 0,1-0,3 mg/ml de dextrano o 1 mg/ml de apolipoproteína E, respectivamente.

30 Para administrar BSA conjugada con fluoresceína (Invitrogen), en primer lugar se incubaron células en medios de cultivo que contenían 5 mg/ml de BSA sin marcar (Sigma) durante 2 horas a 37°C y después se trataron con el dispositivo del ejemplo 2 usando un tampón de administración que contenía 1 mg/ml de la BSA conjugada con fluoresceína. La etapa de incubación previa estaba destinada a minimizar la unión no específica de BSA marcada de manera fluorescente a la superficie celular.

35 Se midió el silenciamiento de GFP para el ejemplo 2 como la reducción en porcentaje en la intensidad de fluorescencia promedio de una población celular con respecto a controles sin tratar. Se prepararon partículas de Lipofectamine 2000 + ARNip combinando 1 µg de ARNip con 1 µl de reactivo Lipofectamine 2000 en 100 µl de PBS. Tras 20 min de incubación a temperatura ambiente, se añadieron 20 µl de esta mezcla a cada pocillo de experimentación que contenía ~20.000 células y 100 µl de medios. Se dejó que las células se incubaran con las partículas durante 18 horas antes del análisis.

45 En el ejemplo 2, se prepararon nanopartículas de oro conjugando polietilenglicol (PEG) de 1000 MW terminado en tiol a la superficie de nanopartículas, después se lavó el PEG en exceso cuatro veces mediante centrifugación (10.000 rcf durante 30 min) y se suspendió el material resultante en PBS hasta una concentración final de 100 nM. Para obtener imágenes de la administración de GNP a células HeLa, se suspendieron las células en PBS complementada con FBS al 3%, F-68 Pluronic al 1% y 47 nM de GNP; se trataron mediante un dispositivo de 10 µm - 6 µm x 5 y se fijaron en glutaraldehído al 2,5% (p/v), paraformaldehído al 3% (p/v) y sacarosa al 5,0% (p/v) en tampón de cacodilato de sodio 0,1 M (pH 7,4). Tras una fijación durante la noche, se fijaron posteriormente las células en OsO<sub>4</sub> al 1% (p/v) en tampón de acetato de veronal durante 1 h. Después se tiñeron en bloque durante la noche con acetato de uranilo al 0,5% en tampón de acetato de veronal (pH 6,0), se deshidrataron y se incorporaron en resina de Spurr. Se cortaron secciones en un dispositivo Reichert Ultracut E (Leica) a un grosor de 70 nm con una cuchilla de diamante. Se examinaron las secciones con un microscopio electrónico EM410 (Phillips).

55 En el ejemplo 2, se usó un sistema de electroporación Neon (Invitrogen) para transfectar células NuFF con dextranos de 70 kDa marcado con fluoresceína y de 3 kDa marcado con azul pacífico. Se siguió el procedimiento del fabricante en el lavado de células y la suspensión de las mismas en los tampones apropiados. Se trataron las células usando una punta de 10 µl a una densidad de 10<sup>7</sup> células/ml con una concentración de dextrano de 0,1 mg/ml. Las tres condiciones usadas fueron las siguientes: 1) un pulso de 20 ms de 1700 V, 2) tres pulsos de 10 ms de 1600 V, 3) dos pulsos de 20 ms de 1400 V. Las condiciones tanto 1 como 3 las recomendaba el fabricante como condiciones óptimas para la transfección de células de fibroblastos humanos con eficiencias de administración de plásmido de eGFP del 84% y el 82%, respectivamente.

65 En las imágenes confocales del ejemplo 2, se centrifugaron muestras a 800 rcf durante 4 min y se lavaron 2-3 veces con PBS antes de la obtención de imágenes. Se tomaron imágenes confocales de células vivas usando la unidad de adición confocal C1 en un microscopio invertido Nikon TE2000-U con una lente de inmersión en agua de aumento

60x. Se excitaron muestras de fluorescencia mediante un láser de 405 nm y se detectaron usando un filtro DAPI convencional (Nikon).

5 En la microscopía de fluorescencia del ejemplo 2, se centrifugaron muestras a 800 rcf durante 4 min y se lavaron 2-3 veces con PBS antes de la obtención de imágenes. Se obtuvieron imágenes usando un microscopio invertido Axiovert 200 (Zeiss) equipado con lentes Neofluar (Zeiss). Se proporcionó excitación de fluorescencia mediante una lámpara de mercurio X-cite 120Q (Light Dynamics). El microscopio está equipado con una cámara Hamamatsu C4742-95 (Hamamatsu) y se analizaron imágenes mediante ImageJ (NIH).

10 En la citometría de flujo del ejemplo 2, para el análisis de células tras un experimento de administración, se lavaron células 2-3 veces con PBS (>100  $\mu$ l por pocillo en una placa de 96 pocillos). Después volvieron a suspenderse en PBS complementada con FBS al 3%, F-68 Pluronics al 1% y yoduro de propidio 10  $\mu$ g/ml (Sigma). Se analizaron las células en un dispositivo LSR Fortessa (BD Biosciences) o FACSCanto (BD Biosciences) equipado con un robot de muestreo de alto rendimiento. Se usaron los láseres de 405 nm y 488 nm para la excitación de los fluoróforos deseados. Se detectaron señales de yoduro de propidio (tinción viva/muerta), fluoresceína y azul pacífico usando filtros de 695 nm de paso largo, de 530/30 y de 450/50, respectivamente. Se llevó a cabo el análisis de datos usando software FACS Diva (BD Biosciences) y FlowJo (FlowJo).

### 20 Ejemplo 3 - Células madre y células inmunitarias

Se administraron satisfactoriamente proteínas, nanopartículas, ARNip, ADN y nanotubos de carbono a once tipos de células diferentes, incluyendo células madre embrionarias y células inmunitarias. De hecho, la capacidad para administrar materiales estructuralmente diversos y su aplicabilidad a células primarias difíciles de transfectar indican que el dispositivo y los métodos tienen una amplia aplicabilidad en aplicaciones de investigación y clínicas.

25 En el ejemplo 3, cada dispositivo consiste en 45 canales microfluídicos paralelos idénticos, que contienen uno o más estrechamientos, grabados químicamente sobre un chip de silicio y sellados mediante una capa de Pyrex. La anchura y la longitud de cada estrechamiento (descritas en más detalle a continuación) oscilan desde 4-8  $\mu$ m y 10-40  $\mu$ m, respectivamente. El dispositivo del ejemplo 3 se hizo funcionar normalmente a una tasa de rendimiento de 20.000 células/s, proporcionando cerca de un millón de células tratadas por dispositivo antes del fallo, debido a la obstrucción. El diseño de canales paralelos se eligió para aumentar el rendimiento, al tiempo que se garantizaba un tratamiento uniforme de células, porque cualquier obstrucción o defecto en un canal no puede afectar a la velocidad de flujo en canales vecinos (el dispositivo puede hacerse funcionar a presión constante). Antes del uso, el dispositivo puede conectarse en primer lugar a una interconexión de acero que conecta los depósitos de entrada y de salida al dispositivo de silicio. Después puede colocarse una mezcla de células y el material de administración deseado en el depósito de entrada y se unen tubos de Teflon a la entrada. Después puede usarse un regulador de presión para ajustar la presión en el depósito de entrada e impulsar las células a través del dispositivo. Las células tratadas pueden recogerse del depósito de salida.

40 Los parámetros que influyen en la eficiencia de administración que se han identificado (véase, por ejemplo, el ejemplo 2 anterior) pueden incluir la velocidad celular, las dimensiones de estrechamiento y el número de estrechamientos (alterando de ese modo las tasas de cizalladura y de compresión experimentadas por las células). Por ejemplo, la eficiencia de administración de moléculas de dextrano de 3 kDa marcado con azul pacífico impermeables a la membrana a células vivas HeLa aumenta de manera monotónica con la velocidad celular a través de diferentes diseños de estrechamiento (por ejemplo, la figura 25 en 2500). Las dimensiones de estrechamiento también tienen un impacto sobre la administración; al aumentar la longitud de estrechamiento desde 20  $\mu$ m hasta 40  $\mu$ m casi se duplicó la eficiencia de administración a todas las velocidades de funcionamiento (por ejemplo, la figura 25 en 2500), con un efecto mínimo sobre la viabilidad (por ejemplo, la figura 25 en 2510). La reducción de la anchura de estrechamiento tuvo un efecto similar. Al aumentar el número de estrechamientos en serie también se aumentó la eficiencia de administración de tal manera que un dispositivo con cinco estrechamientos en serie de 10  $\mu$ m de longitud funcionó mejor que un diseño individual de 10  $\mu$ m, 20  $\mu$ m o 40  $\mu$ m de longitud a lo largo de todas las velocidades celulares (por ejemplo, la figura 25 en 2500 y 2510). En estos datos, los puntos de datos de 0 mm/s corresponden al caso de control mediante el cual las células se someten al mismo tratamiento que las otras muestras pero no se hacen pasar a través del dispositivo, reflejando de ese modo cualquier efecto endocitótico o de unión a superficie.

60 Para investigar la versatilidad de la técnica, se evaluó su capacidad para administrar moléculas de dextrano de modelo a varios tipos de células que tradicionalmente son difíciles de transfectar, especialmente células inmunitarias y células madre. Se usaron dextrano de 70 kDa y de 3 kDa marcados de manera fluorescente para estos experimentos porque son similares en cuanto a tamaño a muchas moléculas de proteínas y ARNip, respectivamente, fáciles de detectar mediante citometría de flujo y tienen efectos de unión a superficie mínimos ya que tienen carga negativa.

65 La figura 30 ilustra la aplicabilidad del presente objeto a lo largo de tipos de células. En 3000 se muestra la eficiencia de administración y la viabilidad de células NuFF tratadas con un dispositivo de 30  $\mu$ m - 6  $\mu$ m para administrar

dextrano de 3 kDa y de 70 kDa. En 3010 se muestra la eficiencia de administración y la viabilidad de células dendríticas murinas aisladas de bazo tratadas con un dispositivo de  $10\ \mu\text{m} - 4\ \mu\text{m}$  para administrar dextrano de 3 kDa y de 70 kDa. En 3020 se muestra la eficiencia de administración y la viabilidad de células madre embrionarias murinas tratadas con un dispositivo de  $10\ \mu\text{m} - 6\ \mu\text{m}$  para administrar dextrano de 3 kDa y de 70 kDa. En 3030 se muestra la eficiencia de administración de dextrano de 3 kDa y en 3040 se muestra de 70 kDa a células B (CD19<sup>+</sup>), células T (TCR- $\beta^+$ ) y macrófagos (CD11b) aislados a partir de sangre completa de ratón mediante centrifugación y tratados mediante dispositivos de  $30\ \mu\text{m} - 5\ \mu\text{m}$  y  $30\ \mu\text{m} - 5\ \mu\text{m} \times 5$  a 1000 mm/s. Se marcaron dextrano de 3 kDa y de 70 kDa con azul pacífico y fluoresceína, respectivamente. Todos los puntos de datos se realizaron por triplicado y las barras de error representan dos desviaciones estándar.

Usando diversos diseños de dispositivo, se administraron moléculas de dextrano a fibroblastos de prepucio humanos de recién nacido (NuFF) (3000), células dendríticas murinas primarias (3010) y células madre embrionarias (3020). Estos experimentos proporcionaron una pérdida mínima (<25%) en la viabilidad celular (3000, 3010 y 3020) y los resultados en células madre embrionarias murinas indican que el método no induce diferenciación. En estudios adicionales, se aislaron glóbulos blancos (capa leucocitaria) a partir de sangre murina mediante centrifugación y se trataron con el dispositivo. Las células B, las células T y los macrófagos, tal como se diferencian mediante tinción con anticuerpos, indicaron la administración satisfactoria de dextrano tanto de 3 kDa como de 70 kDa (3030 y 3040).

Con el fin de ilustrar el potencial del presente objeto para abordar los desafíos de administración actuales, se llevaron a cabo varios experimentos en aplicaciones posibles que oscilaban desde reprogramación celular hasta detección basada en nanotubos de carbono. Además de los materiales específicos de aplicación detallados a continuación, el presente objeto ha demostrado la administración satisfactoria de una variedad de cargas útiles de prueba tales como apolipoproteína E, albúmina sérica bovina y plásmidos de GFP.

La figura 31 ilustra datos de administración de nanomateriales y anticuerpos. En 3100 se muestra la eficiencia de administración y la viabilidad de células HeLa tratadas con un dispositivo de  $10\ \mu\text{m} - 6\ \mu\text{m} \times 5$  para administrar dextrano de 3 kDa marcado con azul pacífico y nanotubos de carbono envueltos en ADN marcados con Cy5. En 3110 se muestran imágenes de células de campo brillante superpuestas con dispersión de Raman en la banda G (rojo) para indicar la administración de nanotubos de carbono en células tratadas (izquierda) frente a endocitosis (derecha). Barras de escala a  $2\ \mu\text{m}$ . En 3120 se muestra una microfotografía fluorescente de una célula HeLa 18 h tras la administración de dextrano de 3 kDa marcado con azul pacífico (panel central) y anticuerpos frente a tubulina con una etiqueta de Alexa Fluor 488 (panel derecho). Barras de escala a  $3\ \mu\text{m}$ . En 3130 se muestra la eficiencia de administración y la viabilidad de células HeLa tratadas con un dispositivo de  $10\ \mu\text{m} - 6\ \mu\text{m} \times 5$ , a 500 mm/s, para administrar anticuerpos anti-tubulina marcados con Alexa Fluor 488. Se compara la eficiencia de administración a diferentes concentraciones de anticuerpos con un control de endocitosis a  $100\ \mu\text{g/ml}$  y células sin tratar.

Verificación de la administración satisfactoria de nanotubos de carbono (encapsulados mediante un oligonucleótido de ADN) mediante citometría de flujo (3100) y espectroscopía de Raman (3110). También se administraron anticuerpos frente a tubulina (3120 y 3130) usando esta técnica, proporcionando una distribución difusa a través de toda la célula que era compatible con administración al citosol. Los materiales anteriormente mencionados son actualmente difíciles de administrar al citosol celular y cada material requiere con frecuencia una modificación especializada para facilitar la administración. En el ejemplo 3, los cuatro materiales se administraron a células HeLa usando el mismo conjunto de condiciones en un dispositivo de  $10\ \mu\text{m} - 6\ \mu\text{m} \times 5$ .

La administración eficiente de proteínas a células primarias puede permitir varias aplicaciones terapéuticas. Un desafío en la reprogramación celular, por ejemplo, es la ineficiencia de métodos de administración de proteínas basados en CPP anteriores. La figura 32 ilustra aplicaciones de administración de proteínas. En 3200 se muestra un análisis de inmunotransferencia de tipo Western de administración de c-Myc, Klf-4, Oct-4 y Sox-2 mediante péptidos que penetran en células frente a un dispositivo de  $10\ \mu\text{m} - 6\ \mu\text{m}$  para células NuFF. Cada una de las cuatro proteínas tiene un grupo de 9 argininas (9R) adicional para facilitar la captación. Las columnas de lavado (Ly) corresponden al contenido en proteína de células que se lavan y someten a lisis mientras que las columnas de caldo corresponden al contenido en proteína del entorno de medios. En 3210 se muestra la eficiencia de administración y la viabilidad de células dendríticas aisladas de bazo tratadas con un dispositivo de  $10\ \mu\text{m} - 4\ \mu\text{m}$  para administrar dextrano de 3 kDa marcado con azul pacífico y ovoalbúmina marcada con Alexa Fluor 488. Todos los puntos de datos se realizaron por triplicado y las barras de error representan dos desviaciones estándar.

Se examinó la capacidad para administrar cuatro factores de transcripción a modo de ejemplo (Oct4, Sox2, c-Myc y Klf-4) a células de fibroblastos humanos y se compararon con un método de CPP (3200). Los resultados muestran que, además de no basarse en endocitosis, que puede dejar mucho material atrapado en endosomas, la administración mediante deformación mecánica rápida proporciona una eficiencia de administración significativamente superior para las 4 proteínas. Este resultado está en línea con el trabajo de simulación anteriormente mencionado que indicó que el presente objeto puede tener una mejora de 10-100 veces en la administración de proteínas con respecto a CPP.

La presentación de antígenos en células dendríticas (DC) es otra área en la que el presente objeto ofrece una

ventaja. Los investigadores han estado explorando métodos para expresar antígenos en los receptores de clase I del MHC de DC para inducir una potente respuesta de células T citotóxicas. El presente objeto, que tiene implicaciones clínicas directas en la preparación de una vacuna contra el cáncer, por ejemplo, se basa en la administración al citosol de proteínas antigénicas, porque la presentación de clase I del MHC es casi exclusiva para proteínas citosólicas. Facilitando la administración directa de material al citosol, el presente objeto sirve como plataforma para generar una respuesta de células T citotóxicas *in vivo* contra un antígeno específico. Para ilustrar esta capacidad, se administró satisfactoriamente ovoalbúmina marcada con Alexa 488, una proteína de antígeno de modelo, a células dendríticas murinas derivadas del bazo (3210). A pesar de la tasa superior de endocitosis en este tipo de célula, el dispositivo produjo un aumento significativo en las tasas de administración con respecto a los controles de endocitosis (0 mm/s). Además, el material administrado está presente en el citoplasma gracias al mecanismo de deformación celular. Esta característica es particularmente importante para la administración de antígenos, porque la presión citoplásmica es un requisito crítico para la presentación de antígeno de clase I del MHC.

El sistema del ejemplo 3 es una herramienta de investigación habilitante con su capacidad para administrar nanotubos de carbono, nanopartículas de oro y anticuerpos (figura 31), tres materiales que son difíciles de administrar con las técnicas actuales. El presente objeto expande significativamente la capacidad para analizar con sonda procesos intracelulares facilitando la tinción con anticuerpos y puntos cuánticos de estructuras/proteínas de células vivas y permitiendo el uso de nanotubos de carbono como sonda molecular citosólica o sensor químico. Como método robusto de administración de proteínas, puede usarse para el examen de alto rendimiento de bibliotecas de péptidos/proteínas porque, a diferencia de la mayoría de las técnicas basadas en CPP o nanopartículas, este método es insensible a la química y estructura de proteínas, pero no se basa en rutas endocitóticas, y no afecta a la funcionalidad de proteínas.

Adicionalmente, el presente objeto es útil para terapia (figura 32). Por ejemplo, se aíslan células diana de un paciente a partir de la sangre u otro tejido, se tratan mediante el dispositivo para administrar el producto terapéutico deseado y vuelven a introducirse en el cuerpo. Un enfoque de este tipo saca el máximo rendimiento de la eficiencia de administración aumentada de macromoléculas terapéuticas y es más seguro que las técnicas existentes, porque elimina la necesidad de partículas de vector potencialmente tóxicas y mitiga cualquier posible efecto secundario asociado con el aclaramiento reticuloendotelial y la administración fuera de la diana.

#### Ejemplo 4 - Vacunaciones contra el cáncer personalizadas

Los desafíos actuales en la administración intracelular de macromoléculas son una barrera significativa para entender mejor los mecanismos de enfermedad y la implementación de nuevos enfoques terapéuticos. A pesar de recientes avances en la tecnología de administración, el tratamiento de células derivadas de pacientes sigue siendo un desafío y los métodos actuales con frecuencia se basan en materiales exógenos o campos eléctricos tóxicos. La plataforma microfluidica y los sistemas y métodos relacionados se basan en la deformación mecánica de células para facilitar la administración. Este enfoque físico controlado ha producido resultados en áreas anteriormente desafiantes, tales como reprogramación celular basada en proteínas y administración de puntos cuánticos.

La manera más eficaz y directa de influir en el comportamiento de una célula es administrando agentes activos al citoplasma celular. Por tanto, la administración intracelular de macromoléculas desempeña un papel crítico en investigación y desarrollo (I+D), con aplicaciones que oscilan desde el descubrimiento de fármacos hasta el estudio de procesos bioquímicos para aplicaciones terapéuticas. Sin embargo, los métodos actuales tienen limitaciones. Con frecuencia tienen una baja eficacia en células derivadas de pacientes (primarias), se basan en material exógeno o campos eléctricos tóxicos y no son adecuados para la administración de materiales estructuralmente diversos, tales como proteínas.

Una plataforma de administración robusta capaz de abordar estos problemas permite avances significativos en investigación biológica y sirve como base para una nueva generación de terapias tales como vacunación contra el cáncer personalizada. Un método de administración de proteínas eficaz para células inmunitarias, por ejemplo, puede servir como plataforma de vacunación contra el cáncer.

Tal como se describió anteriormente, los dispositivos microfluidicos, los sistemas relacionados y los métodos descritos en el presente documento facilitan la administración intracelular de material deformando rápidamente una célula a medida que pasa a través de un estrechamiento. El procedimiento de deformación provoca una alteración transitoria de la membrana celular y de ese modo permite la difusión pasiva de material desde el tampón circundante en el citosol celular. Eliminando la necesidad de los materiales exógenos y campos eléctricos en los que se basan los métodos actuales, este enfoque proporciona un enfoque robusto simplificado para la administración con toxicidad reducida. Por tanto, este método puede servir como una plataforma amplia para administración intracelular de macromoléculas con ventajas en algunas aplicaciones clínicas y de investigación, tales como vacunación contra el cáncer.

La figura 34 es una ilustración que representa un sistema en el que la sangre de un paciente se trata mediante un dispositivo microfluidico para la administración de macromoléculas. Una realización del presente objeto incluye un sistema en el que se tratan células dendríticas (DC), aisladas a partir de la sangre de un paciente, mediante el

dispositivo, *ex vivo*, para activarlas contra un antígeno canceroso particular y después vuelven a introducirse en el torrente sanguíneo del paciente. Por ejemplo, el antígeno administrado es una proteína habitualmente expresada que se sabe que está asociada con una enfermedad particular o una específica del paciente obtenida a partir de una biopsia. Administrando antígenos cancerosos directamente al citoplasma de DC, puede aprovecharse la ruta de presentación de antígenos del MHC-I e inducir una potente respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) en el paciente. Después, estas células T activadas buscan y destruyen cualquier célula cancerosa que exprese el antígeno diana. La flexibilidad de la plataforma en el uso de antígenos establecidos específicos de enfermedad o los derivados directamente a partir del tumor de un paciente le permite tratar a pacientes que son resistentes a otras terapias. De hecho, esto proporciona una respuesta a la enfermedad dirigida y personalizada con efectos secundarios mínimos. Esta realización puede implementarse en un laboratorio de hospital típico (<1 h por tratamiento) con un técnico con formación. Debido a su pequeño tamaño y relativa simplicidad, también puede usarse un sistema de tratamiento accionado por el paciente.

El método de vacuna contra el cáncer se ha demostrado en un modelo de ratón. El sistema se ha usado para la administración satisfactoria y el procesamiento de ovoalbúmina, un antígeno de modelo, a células dendríticas murinas y tal como se indica mediante presentación aumentada del antígeno, péptido SIINFEKL, en receptores de clase I del MHC. Estas células dendríticas tratadas fomentan una respuesta proliferativa de linfocitos T citotóxicos (CTL) *in vitro*. Las DC tratadas vuelven a introducirse en el animal para generar una respuesta de CTL *in vivo*. Los dispositivos son útiles para administrar antígenos a DC aisladas a partir de sangre humana.

Los datos indican que el dispositivo es capaz de administrar material a células primarias sensibles (incluyendo DC) sin provocar una muerte celular excesiva. Por tanto, el daño celular no es un problema grave. La respuesta inmunitaria puede mejorarse aumentando el número de células tratadas, aumentando la cantidad y diversidad de antígeno administrado y/o administrando conjuntamente factores de activación, tales como lipopolisacárido. Se ha observado poca o ninguna toxicidad con células tratadas con el dispositivo, haciendo de ese modo que los métodos no sólo sean viables sino ventajosos para aplicaciones terapéuticas humanas y veterinarias.

#### Ejemplo 5 - Tratamiento de neoplasia hemática

Tal como se describe en el ejemplo 4, la deformación mecánica rápida de células puede proporcionar un medio robusto de administración de antígenos a células dendríticas (DC) y, por tanto, puede ser una plataforma para terapias celulares. Este sistema se basa en el descubrimiento de que la deformación mecánica rápida de células puede provocar la formación de poros de membrana transitorios que permiten la administración por difusión de material a partir del medio circundante. A diferencia de las terapias existentes comentadas anteriormente, este método no se basa en proteínas de fusión personalizadas, presentación cruzada de antígenos, vectores virales, nanopartículas o mecanismos de endocitosis; por tanto, proporciona grandes mejoras en cuanto a la eficacia *in vivo* al tiempo que reduce los costes terapéuticos. La flexibilidad y simplicidad de este enfoque fundamentalmente diferente permite una amplia plataforma para la activación de células dendríticas que puede inducir una respuesta de CD8 frente a una variedad de antígenos cancerosos. El sistema puede seleccionar como diana neoplasias hemáticas, tales como linfoma de células B, que están más predispuestas a terapias inmunitarias, así como varios tipos de cáncer adicionales (por ejemplo, melanoma, cáncer de páncreas, etc.) y proporciona un nuevo enfoque vital y personalizado para combatir la enfermedad.

La terapia celular contra el cáncer es una opción atractiva debido a su capacidad para activar el sistema inmunitario del paciente e impulsar una respuesta de células T de CD8 específica de antígeno de larga duración contra la enfermedad. Estas terapias, tales como el recientemente aprobado Provenge® para cáncer de próstata, tienen efectos secundarios mínimos con respecto a quimioterapias y tratamiento con radiación. Sin embargo, una de las grandes barreras en el desarrollo de terapias celulares ha sido lograr una presentación de antígenos apropiada administrando antígenos en el citoplasma celular. Tradicionalmente, la activación de una respuesta efectora de CD8 se diferencia de una respuesta de CD4 por la ubicación de la proteína foránea que entra en la célula presentadora de antígeno (por ejemplo, célula dendrítica). Las proteínas encontradas en el citoplasma inducen una respuesta de CD8 mientras que las proteínas extracelulares capturadas por endocitosis inducen una respuesta de CD4. Dado que el mecanismo de presentación cruzada dentro de células presentadoras de antígeno sigue siendo elusivo, debe desarrollarse un método fiable de administración del antígeno deseado directamente al citoplasma celular para fomentar terapias que usen la potente respuesta de CD8 efectora citotóxica. Se usa un método eficaz y robusto de administración al citoplasma para células dendríticas como plataforma para inducir respuestas inmunitarias contra una variedad de tipos de cáncer.

Los experimentos en células HeLa, ilustrados en la figura 8A y la figura 11, han indicado que la deformación mecánica rápida de la célula da como resultado la formación de lesiones/poros transitorios en la membrana celular, que permiten la difusión pasiva de material del tampón circundante en el citoplasma celular. Este fenómeno no notificado anteriormente produce células que son viables y proliferan de manera normal tras el tratamiento. Los experimentos han indicado que moléculas más grandes muestran tasas de administración inferiores que las más pequeñas, indicando por tanto un mecanismo de difusión. La administración satisfactoria de ARNip y la tinción de citosol difusa, tal como se midió mediante microscopía confocal, también indican que los materiales administrados están en el citosol y en un estado activo/accesible. Tradicionalmente, los métodos de administración de antígenos

resultan con frecuencia prometedores en líneas celulares pero no consiguen trasladarse a células inmunitarias primarias. Sin embargo, el método de administración descrito en el presente documento es independiente de rutas endocitóticas o de respuesta celular frente a materiales exógenos, que pueden variar significativamente a lo largo de los tipos de células, y se basa principalmente en propiedades de bicapa de membrana. Por tanto, debido a su simplicidad y nueva ruta, esta tecnología está más predispuesta a pasar de línea celular a administración a células inmunitarias primarias y, por tanto, proporciona una mejora principal en la presentación de antígenos.

La presentación de antígenos de clase I del MHC y la maduración de células dendríticas pueden analizarse mediante tinción con anticuerpos en respuesta a la administración de proteína ovoalbúmina. También pueden usarse células T recogidas a partir de ratones transgénicos para TCR OT-I y OT-II para medir la proliferación de CD8 y CD4 en respuesta a la carga con ovoalbúmina y/o antígeno SIINFEKL. El sistema puede optimizarse para una proliferación de CD8 aumentada en comparación con células dendríticas preparadas mediante endocitosis sola.

Se purifican células dendríticas murinas primarias mediante separación de MACS CD11c+ (Miltenyi Biotec, Alemania) a partir de los bazos de ratones B6. Puede usarse un dispositivo que contiene estrechamientos con una anchura de canal de 6  $\mu\text{m}$  capaz de realizar la poración de la membrana de una célula HeLa de 13  $\mu\text{m}$ . Debido al tamaño más pequeño de estas células dendríticas, pueden usarse las prestaciones de microfabricación y pruebas de dispositivos con anchuras de canal de 3-5  $\mu\text{m}$ . Pueden modificarse protocolos existentes para fotolitografía y grabado químico profundo por iones reactivos para permitir una fabricación eficiente de estos dispositivos. Pueden usarse moléculas de dextrano marcadas de manera fluorescente como moléculas de modelo para evaluar la eficiencia de administración mediante FACS. Posteriormente, puede administrarse proteína ovoalbúmina a las células y someterse a ensayo mediante una inmunotransferencia de tipo Western para confirmar la captación de proteína en células primarias.

Puede examinarse la maduración de células dendríticas mediante tinción con anticuerpos frente a CD80 y CD86 para mostrar que el método de deformación rápida induce maduración celular. Puede considerarse el uso de agonistas de TLR extracelular, tales como lipopolisacárido (LPS), si se considera necesario inducir manualmente la maduración de DC tras la administración. Puede administrarse proteína ovoalbúmina a células dendríticas y puede cuantificarse la presentación de antígeno mediante anticuerpos frente a SIINFEKL del MHC-I. Adicionalmente, puede evaluarse la eficiencia de presentación de antígeno en respuesta a la administración de péptidos específicos de TCR para mostrar la capacidad del sistema para administrar/presentar proteínas antigénicas frente a péptidos. Posteriormente, pueden recogerse células T de CD8 y CD4 a partir de ratones OTI y OT-II transgénicos para TCR respectivamente, teñirse mediante CFSE y cultivarse conjuntamente con células dendríticas tratadas con ovoalbúmina durante 5 días. Puede medirse la proliferación de células T de ambos subconjuntos mediante FACS. Puede optimizarse el diseño del dispositivo para producir niveles aumentados de poblaciones de células T de CD8 funcionales en comparación con métodos *in vitro* convencionales (por ejemplo, endocitosis).

Una capacidad versátil de inducir respuestas de CD8 específicas de antígeno ha sido un objetivo de terapias celulares contra el cáncer que ha resultado ser elusivo hasta ahora debido a la presentación de antígeno ineficiente o la flexibilidad inadecuada del método de administración. Los métodos existentes tienen varios inconvenientes incluyendo que se basan en campos eléctricos dañinos, el uso de materiales exógenos, modificación de la secuencia de proteínas y/o rutas endocitóticas para facilitar la administración de antígenos. Sin embargo, el presente objeto proporciona un enfoque fundamentalmente diferente a la administración al citosol que no presenta ninguno de los problemas anteriormente mencionados. Además, debido a la naturaleza de su mecanismo de poración-difusión, este método es ampliamente aplicable a lo largo de tipos de antígeno y, por tanto, puede abordar una gama de cánceres diana. El mismo mecanismo puede usarse incluso para introducir moléculas de señalización adicionales para mejorar la maduración/activación de DC para producir una respuesta de células T más potente. Una plataforma amplia de este tipo es más versátil y robusta que cualquier mecanismo de administración/presentación de antígeno existente en investigación para vacunas contra el cáncer.

El ejemplo 5 puede tener un amplio impacto. Dada la inmensa carga social del cáncer a lo largo del país (570.000 muertes estimadas en los EE.UU. en 2011); es probable que el cáncer afecte a una proporción significativa de la población. La población afectada se beneficia del desarrollo de nuevas terapias celulares que aprovechan el poder del sistema inmunitario del paciente para combatir la enfermedad. El presente objeto es una plataforma de tratamiento personalizada, más eficiente, para una variedad de tipos de cáncer, tales como neoplasias hemáticas, por ejemplo, leucemias, linfomas y mielomas múltiples, así como neoplasias mieloproliferativas y síndromes mielodisplásicos. Los métodos también son particularmente útiles para el tratamiento de cánceres metastásicos, por ejemplo, debido a su propensión a diseminarse mediante la circulación sanguínea. Los cánceres con epítipo antigénico desconocido, por ejemplo, pueden tratarse dirigiendo una muestra de biopsia tumoral, administrando el lisado a DC del paciente y volviendo a introducir las DC en el cuerpo. Esto permitirá activar las células T del huésped frente a una amplia gama de antígenos cancerosos garantizando así un tratamiento eficaz de múltiples dianas. Este aspecto personalizado puede ser de interés particular para personas que pueden desarrollar formas poco frecuentes de cáncer, con frecuencia mal tratados por los tratamientos actuales, debido a la exposición a entornos hostiles. Ajustando a medida el tratamiento a la enfermedad del individuo, este método puede proporcionar atención oportuna y eficaz incluso en los casos más agresivos, tales como cánceres con resistencia a múltiples fármacos. Esta terapia de base inmunitaria también puede ser particularmente eficaz en la prevención de metástasis (responsables de

~90% de las muertes relacionadas con cáncer) ya que las células T de CD8 pueden localizar y destruir fácilmente células metastásicas al tiempo que la memoria inmunológica proporcionada mediante estos tratamientos puede prevenir una futura recidiva. Además, como herramienta de investigación, este método puede permitir estudios mecanísticos sin precedentes de procesamiento de antígenos para entender mejor el procedimiento de presentación cruzada de antígeno y, por tanto, mejorar la eficacia de métodos de activación inmunitaria existentes/alternativos.

#### Ejemplo 6 - Reprogramación celular

Las células madre desempeñan un papel crítico en la investigación actual en medicina regenerativa, especialmente dentro del campo en rápida expansión de ingeniería tisular. Las iPSC son de particular interés debido a su capacidad de autorrenovación, capacidad demostrada para diferenciarse para dar cualquier tipo de célula y características autólogas (específicas de paciente). Por tanto, las iPSC proporcionan una oportunidad para derivar células progenitoras de linaje múltiple a partir de una fuente pluripotente común, que pueden combinarse para dar compartimentos tisulares diferenciados pero interactivos. Además, estas células pueden eliminar finalmente la necesidad de células madre embrionarias humanas (hESC) en aplicaciones clínicas, evitando por tanto muchos de los debates morales y éticos que han plagado a estos tipos de células. Además, las iPSC derivadas de paciente evitan o minimizan los problemas de rechazo inmunitario de células derivadas de hESC. Por tanto, la investigación actual se centra en gran medida en diseñar protocolos eficientes, libres de virus, para producir grandes números de iPSC.

Originalmente se generaron iPSC reprogramando fibroblastos humanos (HF) y murinos adultos a un estado pluripotente basándose en sobreexpresión retroviral de los 4 factores de transcripción Oct 3/4, Sox2, c-Myc y Klf4. Estas iPSC no sólo son en gran medida idénticas a células ES en cuanto a la expresión génica global, metilación de ADN y modificación de histona, sino que además son capaces de diferenciarse para dar tipos de células que representan las 3 capas germinales. Aunque la tecnología de iPSC tiene enorme potencial para investigación biomédica y terapia basada en células, deben superarse obstáculos principales para alcanzar todo su potencial. Por ejemplo, la mayoría de las líneas de iPSC se han derivado a partir de diversas células somáticas mediante introducción retroviral o lentiviral de genes que codifican para factores de reprogramación, dando como resultado múltiples alteraciones de cromosomas mediante integración de vectores virales, cualquiera de las cuales puede provocar disfunción genética y/o tumor. Además, los transgenes de reprogramación (en particular, c-Myc y Klf4) están estrechamente asociados con la oncogénesis, planteando la posibilidad de que su expresión residual y/o reactivación pueda provocar la formación de tumores. Por tanto, muchos laboratorios exploraron recientemente diferentes enfoques sin integración de genoma tales como adenovirus, vectores episomales, ARNm y microARN. De manera notable, se ha mostrado que pueden generarse iPSC mediante administración directa de los cuatro factores de reprogramación (Oct 3/4, Sox2, c-Myc y Klf4) fusionados a péptidos que penetran en células (CPP). Aunque se ha notificado que la generación de iPSC de ratón puede producirse mediante administración de cuatro factores fusionados a CPP expresados en *E. coli*, también puede mostrarse que pueden generarse iPSC humanas mediante cuatro factores fusionados a CPP expresados en células de mamífero. Sin embargo, ambos estudios notificaron que las eficiencias de reprogramación de reprogramación basada en proteínas son muy bajas (<0,01%). Dado que la reprogramación basada en proteínas no implica ningún tipo de material genético (ADN o ARN) ni vehículo de vector (virus o plásmido), la administración directa de proteínas proporciona uno de los procedimientos de reprogramación más seguros. Se ha mostrado que iPSC humanas basadas en proteínas generaron de manera eficiente neuronas dopaminérgicas funcionales sin propiedades anómalas asociadas con la integración de genoma viral. Dado que la eficiencia de la reprogramación basada en proteínas puede mejorarse mediante el presente objeto usando la tecnología de plataforma de administración, abre ampliamente la posibilidad de generar células iPSC clínicamente viables. Además, este enfoque permite un nivel de control más fino sobre la función celular evitando los procedimientos estocásticos que gobiernan la traducción y/o transcripción en la reprogramación de ARNm, plásmidos y viral. Por tanto, la administración directa de proteínas proporciona dos ventajas fundamentales con respecto a métodos alternativos al eliminar el riesgo de inserción mutagénica y permitir un control más preciso del procedimiento de reprogramación altamente sensible. La tecnología de administración descrita en el presente documento ha demostrado su capacidad para administrar proteínas a altas eficiencias para HF y células madre. Experimentos que comparan las capacidades de administración de esta técnica con metodologías de péptidos que penetran en células existentes han mostrado un aumento significativo en la administración usando este enfoque (posiblemente 100 veces superior basándose en simulaciones). Además, su mecanismo de poración física elimina la necesidad de modificación química o el uso de compuestos exógenos que participan en métodos alternativos de administración de proteínas. También pueden administrarse conjuntamente moléculas pequeñas, ARNi y otros factores durante la reprogramación dado que el método es indiferente en cuanto al tipo de material que está administrándose. Por tanto, este sistema proporciona una herramienta única para inducir reprogramación celular mediante administración directa de proteínas. Este mecanismo de acción sencillo (es decir, difusión a través de poros) también permite predecir posiblemente y controlar las cantidades de administración con una alta precisión, facilitando por tanto estudios de optimización para mejorar la comprensión de la dinámica de reprogramación y, de ese modo, aumentar en gran medida las eficiencias. Finalmente, puede desplegarse esta técnica microfluidica como dispositivo médico para generar iPSC para aplicaciones de ingeniería tisular clínica y terapia celular.

Además, las aplicaciones de este sistema no están limitadas a la administración de proteínas. Esta técnica puede incluir un método de administración universal capaz de administrar una gama de macromoléculas (ADN, ARN,

proteínas, azúcares y péptidos) a casi cualquier tipo de célula. Esto permite una gran cantidad de aplicaciones que reciben servicio insuficiente por las tecnologías actuales. Los métodos actuales basados en liposomas, nanopartículas y electroporación, por ejemplo, con frecuencia se esfuerzan por transfectar determinadas células primarias (tales como células inmunitarias o células madre) y pueden ser ineficaces en la administración de proteínas y nanopartículas (tales como puntos cuánticos). La administración de péptidos para aplicaciones de examen terapéutico y mecanismo de enfermedad también puede abordarse mediante este nuevo método mientras que las prácticas actuales con frecuencia requieren modificación química o encapsulación. También puede usarse este método para aplicaciones de detección basadas en nanopartículas para administrar puntos cuánticos modificados para marcaje de orgánulos o estudios mecanísticos de enfermedades.

La administración intracelular es una piedra angular de muchas aplicaciones de investigación biológica que oscilan desde estudios fundamentales de expresión génica hasta mecanismos de enfermedad y, tal como se aborda en esta solicitud, generación de iPSC. Los métodos de administración establecidos, tales como liposomas, nanopartículas poliméricas y electroporación, con frecuencia implican el uso de compuestos exógenos como vehículo de administración (o campos eléctricos en el caso de electroporación) y son específicos de material y/o célula. Por ejemplo, Lipofectamine (Invitrogen) puede administrar moléculas de ADN y ARN (a subconjuntos de líneas celulares o células primarias) pero no puede formar el complejo apropiado para administrar proteínas u otras macromoléculas. Por otro lado, la electroporación, aunque prometedora en cuanto a su capacidad para seleccionar como diana una variedad de tipos de células, provoca daño a la célula debido a los altos campos eléctricos y ha tenido un éxito limitado en la administración de proteínas. Esto hace que sea particularmente inadecuada para las múltiples transfecciones requeridas en la generación de iPSC, por ejemplo. Los péptidos que penetran en membrana son otra técnica de administración que es ampliamente específica para proteínas. Sin embargo, estos métodos basados en péptidos tienen efectos impredecibles sobre la funcionalidad de proteínas y presentan una degradación de proteínas significativa en el endosoma. Por tanto, el presente objeto que describe un método universal capaz de administrar una gama de macromoléculas (ADN, ARN, proteínas, péptidos, moléculas pequeñas), con muerte celular mínima, permite un control sin precedentes sobre la función celular en una única plataforma de tecnología, permitiendo de ese modo estudios de mecanismo de enfermedad, identificación de candidatos terapéuticos macromoleculares, diferenciación guiada o reprogramación de células madre y el desarrollo de técnicas de diagnóstico con líneas de células notificadoras.

El dispositivo microfluídico descrito en el presente documento puede servir como plataforma de administración universal de base amplia. Como dispositivo microfluídico, disfruta de los beneficios de un control preciso sobre las condiciones de tratamiento a nivel de células individuales. La combinación única de control a nivel de células individuales y rendimiento a escala macroscópica pone este dispositivo en una posición única con respecto a métodos de administración existentes. Los datos hasta ahora han demostrado la capacidad del sistema para administrar material a más de 11 tipos de células diferentes incluyendo líneas de células cancerosas, células madre embrionarias, fibroblastos primarios y linfocitos primarios. Su mecanismo de poración mecánica también ha permitido la administración de materiales anteriormente desafiantes tales como nanotubos de carbono y puntos cuánticos.

Trabajo anterior usando proteínas recombinantes para producir iPSC ha demostrado unas eficiencias excesivamente bajas (<0,01%) y, por tanto, no es adecuado para una aplicación clínica extendida. Sin embargo, el dispositivo, los sistemas y los métodos mencionados en el presente documento han demostrado su capacidad para administrar proteínas directamente al citoplasma con alta eficiencia y muerte celular mínima, proporcionando de ese modo una oportunidad convincente para producir ganancias sustanciales en la eficiencia de reprogramación mediante una administración más eficaz. Al determinar directamente la cantidad de proteína disponible, puede ejercerse un control preciso sobre la cinética intracelular. Por otro lado, otros métodos de reprogramación (por ejemplo, expresión viral, de plásmido y de ARNm), se basan en efectos estocásticos para determinar el nivel de disponibilidad de proteínas y, por tanto, no son adecuados para estudios cinéticos. La baja eficiencia de las metodologías de reprogramación actuales indica que el procedimiento es altamente sensible a variaciones estocásticas y sólo un estrecho intervalo de niveles de expresión de factores de transcripción dará como resultado la reprogramación. Al administrar directamente proteínas al citoplasma, puede ejercerse un control sin precedentes sobre la disponibilidad de proteínas y, por tanto, imponer más sistemáticamente las condiciones exactas necesarias para la reprogramación. Estas condiciones, una vez identificadas y optimizadas, pueden reproducirse con precisión para cada célula que se somete a tratamiento y, por tanto, mejorar drásticamente la eficiencia de reprogramación.

Esta técnica permite/mejora una variedad de aplicaciones de administración intracelular. Además, la naturaleza estrictamente mecánica de la técnica elimina cualquier posible complicación que surja del uso de agentes químicos o campos eléctricos. Los datos no han revelado ningún cambio sustancial en el comportamiento celular como resultado del tratamiento. Por tanto, este sistema es un mecanismo de administración intracelular robusto, de alto rendimiento, alta eficiencia, universal, con utilidad particular en aplicaciones de reprogramación.

Las evidencias indican que la rápida deformación que se produce a medida que una célula pasa a través del estrechamiento induce la formación de poros transitorios en la membrana celular permitiendo la difusión de macromoléculas a partir del tampón circundante en el citosol. Esta técnica se ha demostrado en 11 tipos de células diferentes incluyendo líneas de células cancerosas, fibroblastos primarios, linfocitos primarios y células madre

embrionarias (sin provocar diferenciación). Un prototipo es capaz de tratar ~20.000 células/s y funcionar a un intervalo de concentraciones de células ( $10^4$ - $10^8$  células/ml). También se han mitigado en gran medida problemas relacionados con la obstrucción mejorando los protocolos de experimentación y el diseño del chip de tal manera que cada dispositivo es capaz de tratar ~1 millón de células antes de la obstrucción, con la opción de limpiarse y reciclarse. Además, el diseño de múltiples canales proporciona redundancia significativa de tal manera que la obstrucción de un canal no afecta al rendimiento de los demás. El flujo impulsado por presión (a presión constante controlada) y el diseño en paralelo de los canales garantizan un perfil de flujo sistemático por canal independientemente del porcentaje de canales obstruidos en el chip.

Se ha demostrado la capacidad del dispositivo para administrar moléculas de dextrano a fibroblastos humanos y células madre embrionarias. La figura 35 ilustra las posibles ventajas de reprogramación celular. En 3500, la eficiencia de administración y la viabilidad de células madre embrionarias humanas tratadas con un dispositivo de  $10\ \mu\text{m}$  -  $6\ \mu\text{m}$  para administrar dextrano de 3 kDa. En 3510, un análisis por inmunotransferencia de tipo Western de la administración de c-Myc, Klf-4, Oct-4 y Sox-2 mediante péptidos que penetran en células frente a un dispositivo de  $10\ \mu\text{m}$  -  $6\ \mu\text{m}$  para células NuFF. Las columnas de lisado (Ly) corresponden al contenido en proteína de células que se lavan y someten a lisis mientras que las columnas de caldo corresponden al contenido en proteína del entorno de medios. En 3520, imágenes de microscopía confocal de células NuFF fijadas tras la administración de los factores de reprogramación. Las proteínas se marcan con etiqueta usando un anticuerpo anti-FLAG conjugado con Alexa 488 y el núcleo se tiñe mediante DAPI.

Además, se comparó la eficiencia de administración del dispositivo con la de un método de 9 argininas (CPP) actualmente usado para la reprogramación basada en proteínas. Los resultados (3510) demostraron un aumento significativo en la cantidad de c-Myc, Klf4, Oct4 y Sox2 administrados tal como se midió mediante inmunotransferencia de tipo Western. Después, la microscopía confocal confirmó la ubicación satisfactoria de estos factores de transcripción en el núcleo celular (3520). Se desarrolló un modelo simple de difusión en 2-D en COMSOL para simular el mecanismo de administración basándose en valores de la bibliografía para difusividades de partículas al interior y al exterior del citoplasma celular. Al ajustar este modelo a los datos experimentales puede estimarse que la técnica administra el 10-40% del material de administración presente en el tampón en el citosol celular. En comparación, se estima que los métodos de CPP para la administración de proteínas sólo administran el 0,1% del material de tampón al citosol. Por tanto, este enfoque proporciona un aumento robusto en la cantidad de material de reprogramación administrado (10-100 veces). Además, garantiza una mayor biodisponibilidad de los factores de transcripción administrados.

La figura 36 representa la generación y la caracterización de líneas de iPSC de ratón y humanas mediante administración directa de proteínas de reprogramación fusionadas. En 3600, cultivo inicial de hepatocitos de ratón (primera imagen); morfología tras tratamiento de proteínas de 6 ciclos (segunda imagen); colonias de iPS establecidas (tercera imagen); y tinción con AP de colonias de iPS establecidas (cuarta imagen). En 3610, inmunotinción de marcadores de ESC (Nanog, Oct4 y SSEA1) en p-miPSC. Se tiñeron los núcleos con DAPI (azul). En 3620, el análisis de secuenciación con bisulfito del promotor Oct4 revela reprogramación epigenética casi completa en las líneas p-miPSC-1 y p-mi-PSC-2. Los círculos blancos y negros indican CpG sin metilar y metilado, respectivamente. En 3630, se analizó el potencial de diferenciación *in vivo* inyectando p-mi-PSC en ratones inmunodeficientes y mediante tinción con H&E de teratomas. Los teratomas resultantes contenían tejidos que representaban las tres capas germinales; células de linaje ectodérmico (tubo neural o epidermis), mesodérmico (cartilago o músculo) y endodérmico (epitelio respiratorio o epitelio de tipo intestinal). En 3640, quimeras derivadas a partir de p-mi-PSC-1 (panel izquierdo) y p-miPSC-2 (panel derecho) en fetos E13.5 muestran un alto nivel de GFP a partir de p-miPSC inyectadas. En 3650 a 3670, se generan líneas de iPSC humanas, p-hiPSC-01 (3660) y p-hiPSC-02 (3670), mediante administración directa de cuatro factores de reprogramación fusionados a CPP a partir de fibroblastos humanos adultos obtenidos por biopsia (3650).

La figura 37 representa resultados preliminares de reprogramación de proteínas. En 3700, una progresión de cambios morfológicos a partir de fibroblastos para dar colonias. Las flechas blancas indican posibles células reprogramadas. La flecha roja apunta hacia iPSC coalescentes que forman una colonia. En 3710 a 3760, expresión del marcador de células madre embrionarias humanas Oct4, SSEA-4, Tra-60, Tra-80, fosfatasa alcalina (AP) en colonias de iPSC. Cuando sea apropiado, el recuadro pequeño representa una contratinción con DAPI. Barras de escala a  $100\ \mu\text{m}$ .

Dado que se generaron y caracterizaron iPSC humanas basadas en proteínas, se generaron iPSC humanas y de ratón totalmente reprogramadas adicionales mediante el método de administración anterior de factores de reprogramación fusionados a CPP, tal como se examinó mediante todos los criterios incluyendo análisis epigenéticos, pluripotencia *in vivo* y formación de quimeras (figura 36). Sin embargo, a pesar del uso de proteínas parcialmente purificadas, la eficiencia de reprogramación todavía era baja (<0,1%) y tardó mucho más que los métodos de reprogramación viral. Por tanto, se intentó usar el dispositivo para administrar 4 proteínas de reprogramación Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc a fibroblastos humanos a una concentración de tampón de  $80\ \mu\text{g/ml}$ . Se trataron células 4 veces con un intervalo de 48 h entre cada administración. Después de 14-20 días en cultivo, aparecieron las primeras colonias de tipo hiPSC reprogramadas. Durante este tiempo, se observó la transición en la

morfología de fibroblastos a medida que formaban colonias de iPSC y expresaban varios marcadores de hESC (figura 37).

La clatrina, caveolas y la macropinocitosis son los tres mecanismos más habitualmente propuestos para internalización endocitósica. Para examinar si la endocitosis participa en la administración macromolecular tras la deformación celular rápida, es posible usar productos químicos conocidos para bloquear estos mecanismos. Específicamente, puede usarse clorpromazina para inhibir la endocitosis mediada por clatrina; genisteína para inhibir la endocitosis mediada por caveolas; y 5-(N-etil-N-isopropil)amirolida (EIPA) para inhibir la macropinocitosis (todos pueden adquirirse de Sigma Aldrich). Pueden incubarse células HeLa con clorpromazina (10  $\mu\text{g/ml}$ ), genisteína (200  $\mu\text{M}$ ) y EIPA (25  $\mu\text{M}$ ) durante 2 horas antes del tratamiento. Después pueden administrarse proteínas dextrano, dsRED y dsRED-9R mediante deformación rápida de las células tratadas. Las eficiencias de administración respectivas, tal como se miden mediante FACS, pueden ilustrar la influencia de la inhibición de la endocitosis sobre mecanismos de administración basados tanto en CPP como en dispositivo. Experimentos de ubicación conjunta con marcadores endosómicos (Invitrogen) usando microscopía confocal también pueden ayudar a determinar el porcentaje de material que se secuestra en endosomas.

Es posible acoplar el sistema de deformación celular rápida con otros métodos de administración establecidos, tales como electroporación, para mitigar mecanismos endocitósicos. Incorporar electrodos cerca del estrechamiento puede acoplar la deformación y electroporación para permitir que los efectos de administración proporcionen un rendimiento de sistema potenciado con respecto a cualquier método individual. Además, la administración conjunta de agentes químicos tales como cloroquina (Sigma), diversos polímeros o péptidos que escapan del endosoma, puede usarse para ayudar al escape del endosoma de materiales administrados en el sistema de deformación celular rápida.

A medida que una célula pasa a través del estrechamiento, experimenta una breve ( $\sim 10\text{-}100 \mu\text{s}$ ) pero rápida cizalladura y compresión. Anteriormente se ha mostrado que la cizalladura tangencial induce formación de poros. Sin embargo, el sistema también induce compresión mecánica. Para evaluar estos parámetros, pueden incubarse células HeLa y HF en lantrunculina A 0,1  $\mu\text{g/ml}$  (Invitrogen) durante 1 hora antes de la administración para despolimerizar el citoesqueleto de actina. Después puede administrarse dextrano marcado de manera fluorescente (Invitrogen) a la población celular tratada usando el dispositivo de deformación rápida. Estos experimentos también pueden repetirse con células que se han incubado en colchicina 10  $\mu\text{M}$  (Sigma) durante 2 horas antes de la administración para despolimerizar la red de microtúbulos. Puede usarse análisis de FACS para medir las eficiencias de administración de células tratadas con toxina con respecto a controles sin tratar. Se cree que la formación de poros se correlaciona con la tasa de deformación de una célula en respuesta a una geometría dada. El papel del citoesqueleto en resistir a la deformación se investigó anteriormente usando un dispositivo que analiza con sonda la capacidad de deformación celular para proporcionar mediciones cuantitativas de tasas de deformación. En este método, se colocan electrodos a cada lado de un estrechamiento y se mide el cambio en la capacitancia entre los dos electrodos a medida que pasa una célula a través. Después se correlacionan los cambios en la capacitancia a través del estrechamiento con el tiempo de tránsito de célula, es decir, su tasa de deformación. El rendimiento de administración del dispositivo, en los experimentos mencionados anteriormente, puede correlacionarse con estos estudios de deformación anteriores para producir una relación cuantitativa entre la tasa de deformación y la eficiencia de poración.

De manera similar a estudios publicados que caracterizan la sonoporación, pueden emplearse técnicas de microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM) en muestras fijadas a intervalos de tiempo definidos tras el tratamiento para medir directamente el tamaño y la distribución de los poros propuestos a lo largo del tiempo. La fijación celular puede realizarse a temperatura ambiente usando una disolución de glutaraldehído al 25% (Sigma). Después pueden deshidratarse las muestras de células mediante lavados de etanol sucesivos antes de la obtención de imágenes. Pueden usarse técnicas de SEM ambiental (ESEM) para obtener directamente imágenes de muestras fijadas. Sin embargo, debido a su resolución relativamente baja ( $\sim 200 \text{ nm}$ ), esta técnica es adecuada para detectar lesiones o cambios morfológicos a escala de 1-0,5  $\mu\text{m}$ . Si ESEM no logra detectar ningún cambio morfológico, pueden recubrirse las células con una capa de oro de 1-10 nm usando un evaporador de vacío para potenciar la resolución hasta la escala nanométrica necesaria para observar directamente estructuras de poros más finos usando SEM. También puede usarse TEM como técnica alternativa de obtención de imágenes si SEM no logra producir los resultados deseados. Estas técnicas permiten distinguir entre una lesión local y un mecanismo de poración uniforme de administración y medir la distribución y el tamaño de poro promedio. El tamaño de poro y la distribución en células que se sometieron a deformación celular rápida pueden compararse con células sin tratar. Una distribución de poros localizada en la superficie de membrana indica un modelo de lesión mientras que una distribución más uniforme respalda el modelo de poración uniforme.

Puede usarse el software de multifísica de COMSOL para construir un modelo en 3D de la célula sometida a poración. Usando datos publicados sobre difusividades de citoplasma y de tampón, en combinación con los modelos de poros apropiados a partir de estudios mecanísticos, es posible producir un modelo predictivo de administración. El modelo emula una membrana porosa que separa un citoplasma de baja difusividad de una región de tampón de alta difusividad. Según las suposiciones del modelo, los poros tienen un tamaño fijo durante una cantidad de tiempo

fija antes de volver a sellarse instantáneamente. Puede incorporarse un comportamiento de poros dinámico, tal como cambios de forma y diámetro, en modelos complejos mediante acoplamiento con MatLab u otro software. Pueden verificarse las predicciones simuladas de cantidad de administración usando datos experimentales basados en FACS y electroforesis en gel (por ejemplo, inmunotransferencias de tipo Western). Estas comparaciones pueden usarse para realizar un ajuste fino del modelo y, por tanto, permitirle predecir la cantidad de material administrado. Las capacidades predictivas de este modelo pueden simular los efectos de hacer variar el tamaño de poro, el tiempo de apertura de poro y las concentraciones de tampón y, por tanto, puede usarse como orientación para futuros estudios.

También pueden usarse simulaciones de multifísica (por ejemplo, COMSOL o CFD-ACE) para modelar el flujo de fluido a través del dispositivo. Estos modelos pueden usarse para predecir con mayor precisión velocidades de flujo y tensiones de cizalladura en las regiones de entrada, de salida y de estrechamiento. Estos datos pueden usarse para esclarecer vínculos entre tensiones de cizalladura y velocidad de flujo con la eficiencia de administración a lo largo de diseños de estrechamiento. Además, construyendo un modelo amplio del dispositivo es posible estudiar la sistematicidad de caídas de presión entre diferentes canales y ajustar los diseños de entrada y de salida para garantizar que todos los canales funcionan en condiciones casi idénticas para mejorar la uniformidad de tratamiento a lo largo de la población celular.

El fenómeno de administración puede optimizarse principalmente para aumentar la eficiencia de administración y la viabilidad celular. Puede usarse la uniformidad de población (es decir, administrar una cantidad de material similar para cada célula) como parámetro de optimización secundario. Resultados iniciales han identificado la velocidad celular, la longitud de estrechamiento, la anchura de estrechamiento y la forma de región de entrada como parámetros sensibles. Por otro lado, la composición de medios no parece ser un factor principal. Es posible construir una serie de dispositivos, que varían sistemáticamente la longitud y la anchura de estrechamiento entre 5-50  $\mu\text{m}$  y 4-8  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Son posibles diferentes ángulos de sección decreciente a medida que el canal principal se estrecha para formar el estrechamiento. Los datos de eficiencia y viabilidad experimentales a partir de estos dispositivos, tal como se midieron mediante FACS, pueden correlacionarse con los datos de modelado anteriormente mencionados para entender mejor los efectos de tensión de cizalladura y dimensiones de estrechamiento. Este procedimiento puede repetirse para diferentes líneas celulares, que pueden responder de manera diferente al tratamiento. Estos datos pueden usarse para desarrollar dispositivos con geometrías y parámetros de funcionamiento optimizados para tipos específicos (o subconjuntos específicos de tipos) de células.

La figura 38 representa microfotografías que ilustran estructuras de dispositivo alternativas. Microfotografía de campo brillante de un trabajo preliminar que combina un estrechamiento y electrodos (barra de escala 30  $\mu\text{m}$ ). Tal como se ilustra en la figura 38, el dispositivo puede modificarse acoplado el fenómeno de deformación rápida con electroporación. Pueden incorporarse electrodos de oro a cada lado del estrechamiento mediante formación de patrones por fotolitografía y deposición de Au para introducir un campo eléctrico localizado en el canal. Experimentos posteriores pueden identificar valores de parámetros de funcionamiento (intensidad de campo eléctrico, frecuencia y velocidad de funcionamiento) que demuestren un rendimiento mejorado con respecto a los métodos actuales. Acoplado dos mecanismos de poración independientes, puede ejercerse un control más fino sobre el sistema y manipular múltiples parámetros para optimizar el rendimiento del sistema para cada tipo de célula. Adicionalmente, pueden usarse campos eléctricos como fuerza motriz para administrar moléculas cargadas más grandes, tales como ADN, que presentan bajas tasas de difusión.

Es posible una versión simplificada, desechable, del sistema adecuada para su uso por posibles colaboradores. Puede usarse moldeo por inyección o grabado en caliente de PMMA y policarbonato para implementar una versión basada en polímero del dispositivo. La posterior reducción de costes permitirá usar estos dispositivos como herramienta desechable mejorando así la esterilidad y facilidad de uso. Además, simplificando las conexiones de tubos, el sistema de montaje y la configuración de regulador de presión, resulta viable suministrar un sistema fácil de usar.

Es posible la reprogramación basada en proteínas de fibroblastos para dar células iPS y estudios de optimización del espacio de parámetros de reprogramación. Estudios anteriores han mostrado que pueden generarse iPSC mediante administración directa de factores de reprogramación fusionados a CPP a partir de tejidos tanto humanos como de ratón (figura 36) y que estas proteína-iPSC pueden diferenciarse para dar células funcionales (por ejemplo, neuronas dopaminérgicas) sin fenotipos anómalos asociados con iPSC virales. Sin embargo, debido a muchos factores incluyendo degradación de proteínas en cultivo, ineficiencias de administración y degradación dentro de los endosomas de las células, las eficiencias de reprogramación mediante administración directa de proteínas son demasiado bajas (<0,01%) para cualquier uso práctico. Los dispositivos microfluidicos descritos en el presente documento pueden aumentar significativamente la eficiencia de reprogramación basada en proteínas permitiendo una administración de proteínas eficiente directamente al citoplasma, evitando de ese modo el entorno endosómico duro y el procedimiento de escape del endosoma complicado habitualmente encontrado en métodos de administración de proteínas libres o encapsuladas.

La generación de iPSC humanas se ve facilitada por la administración basada en microfluidos. El dispositivo se usa para administrar una o más, por ejemplo, 4 proteínas de reprogramación (c-Myc (proteína, número de registro de

Genbank NP\_002458.2; ADN, número de registro de Genbank NM\_002467.4), Klf4 (proteína, número de registro de Genbank AAH30811.1; ADN, número de registro de Genbank NM\_004235.4), Oct4 (proteína, número de registro de Genbank ADW77326.1; ADN, número de registro de Genbank HQ122675.1) y Sox2 (proteína, número de registro de Genbank NP\_003097.1; ADN, número de registro de Genbank NM\_003106.3)) a fibroblastos humanos embrionarios (HF). Además de los cuatro factores de Yamanaka (MKOS que es c-Myc-Klf4-Oct4-Sox2), se han identificado varios factores adicionales (por ejemplo, Lin28 (proteína, número de registro de Genbank AAH28566.1; ADN, número de registro de Genbank NM\_024674.4) y Nanog (proteína, número de registro de Genbank AAP49529.1; ADN, número de registro de Genbank NM\_024865.2), Esrrb (proteína, número de registro de Genbank AAI31518.1; ADN, número de registro de Genbank NM\_004452.3), Glis1 (proteína, número de registro de Genbank NP\_671726.2; ADN, número de registro de Genbank NM\_147193.2) y PRDM14 (proteína, número de registro de Genbank NP\_078780.1; ADN, número de registro de Genbank NM\_024504.3)) para potenciar la eficiencia de reprogramación. Se ha establecido completamente que la expresión y purificación en mamíferos de 6 factores (MKOS + Lin28 y Nanog; MKOSLN) y se ha establecido la bioactividad de cada factor usando ensayos indicadores. Estos factores pueden expresarse o bien en *E.coli* o bien en células de mamífero. Dado que las proteínas expresadas en *E. coli* carecen de modificaciones postraduccionales tales como fosforilación, acetilación y ubiquitinación, pueden usarse proteínas purificadas tras la expresión en células de mamífero (HEK293 y CHO). Pueden usarse proteínas expresadas en *E. coli* (comercialmente disponibles de Stemgent, Cambridge, MA) para comparación. En primer lugar, pueden volverse a suspender factores de reprogramación marcados con etiqueta FLAG expresados en células HEK293 mediante transfección en un tampón de lisis celular NP40 que contiene Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 250 mM, EDTA 5 mM, NP-40 al 1% e inhibidores de proteasa. Tras la centrifugación, puede añadirse fracción soluble recogida con gel de afinidad de agarosa de M2 anti-FLAG equilibrado. Tras lavar con PBS dos veces, se eluyeron las proteínas marcadas con etiqueta FLAG retenidas añadiendo 0,1 mg/ml de péptido FLAG (Sigma). Puede aplicarse al dispositivo una disolución en suspensión de fibroblastos humanos y 4 ó 6 proteínas purificadas y pueden sembrarse células tratadas en placas recubiertas con gelatina al 0,1% con medios hESC acondicionados durante 1, 2 ó 3 días antes del siguiente ciclo de administración. Tras repetir ciclos de administración de proteínas (6-16) con el dispositivo microfluídico, se sembrarán en placa células tratadas en fibroblasto embrionario de ratón (MEF) tratado con mitomicina C y se harán crecer durante 3-4 semanas con medios hESC regulares. Las colonias de iPSC pueden volverse visibles dentro del plazo de 3 semanas tras sembrar en MEF. Puede compararse la eficiencia de generación de iPSC con aquella mediante administración de proteínas usando las proteínas recombinantes fusionadas a CPP originales. Estos candidatos de iPSC pueden examinarse exhaustivamente para detectar todos los criterios de iPSC auténticas, incluyendo propiedades moleculares y celulares así como pluripotencia *in vitro* e *in vivo*, tal como se describió anteriormente. Usar 4 ó 6 factores generará líneas de iPSC con una eficiencia muy mejorada. También es posible expresar adicionalmente factores adicionales tales como Esrrb, Glis1 y PRDM14 y usar estos factores en experimentos de reprogramación.

Pueden administrarse en combinación proteínas de reprogramación y ARNm y/o microARN. El dispositivo microfluídico puede usarse para administrar no sólo proteínas sino también cualquier otra macromolécula. Para aprovechar esta propiedad única para reprogramación óptima sin integración en el genoma, es posible combinar el uso de factores de reprogramación y ARNm y/o microARN. En particular, resulta de gran interés que pueden generarse satisfactoriamente líneas de iPSC usando únicamente microARN. De hecho, la transfección basada en Lipofectamine de microARN puede generar colonias de tipo iPSC. Dado que los microARN inducen probablemente reprogramación en un mecanismo diferente de los factores de reprogramación, la combinación apropiada tanto de proteínas de reprogramación como de microARN mediante el dispositivo microfluídico puede potenciar adicionalmente la eficiencia de reprogramación. La administración combinada de proteínas y ARNm puede facilitar significativamente las eficiencias de reprogramación. Por tanto, puede administrarse un tratamiento combinado óptimo de proteínas, ARNm y/o microARN usando el dispositivo microfluídico. Aunque el microARN/ARNm puede no ofrecer el nivel equivalente de control que las proteínas, la capacidad del dispositivo para estudios de optimización de alto rendimiento todavía proporciona ganancias significativas en cuanto a la eficiencia con respecto a enfoques anteriores.

Las características únicas del dispositivo microfluídico pueden permitir la administración de diversas cantidades cuantificadas de cada factor, de una manera controlada y repetible. La optimización del presente objeto facilita el desarrollo de una herramienta fiable de alta eficiencia para la administración de proteínas a HF. Es posible esclarecer las cantidades y frecuencias de administración óptimas de cada factor de reprogramación. A diferencia de los métodos de ARNm, de plásmidos o virales, el sistema no se basa en la naturaleza estocástica de la expresión y/o traducción génica para determinar la concentración intracelular eficaz de factores de transcripción. Por tanto, la capacidad del dispositivo para administrar proteína directamente al citosol lo pone en una posición única para ejercer un control preciso sobre el entorno intracelular. Es posible una serie de calendarios de administración que hacen variar la frecuencia de tratamiento (una vez cada 1, 2 ó 3 días) y la concentración de proteína de cada uno de los cuatro factores de manera independiente. En particular, basándose en varios informes que indican que niveles superiores de Oct4 son críticos para una reprogramación eficiente, es posible someter a prueba el efecto de usar diferentes concentraciones de Oct4 al tiempo que se mantienen las concentraciones de los otros factores iguales. Pueden evaluarse diferentes concentraciones de c-Myc para un tipo de célula dado porque se ha encontrado que sus altos niveles generan colonias principalmente transformadas en lugar de iPSC en algunas situaciones. Además, es posible someter a prueba el efecto de un tratamiento más frecuente de c-Myc debido a su semivida extremadamente corta (~30 min) con concentración apropiada.

La optimización del tratamiento temporal de factores de reprogramación se ve facilitada usando los métodos descritos. Cada factor tiene un papel funcional y participa en el procedimiento de reprogramación. Se necesita al menos uno y, en algunos casos, combinaciones de factores para lograr el resultado de reprogramación deseado.

5 Por ejemplo, se sabe que c-Myc suprime la expresión de genes de diferenciación. Además, se sabe que Klf4 reprime el microARN let-7, que está relacionado con rutas de diferenciación y con inhibición de la pluripotencia. Por tanto, puede ser posible una reprogramación temporalmente regulada tratando c-Myc y/o Klf4 durante el periodo inicial, basándose en una condición inferior a la óptima. Además, aunque no se requiere Nanog para la generación de iPSC, se sabe que es crucial para el establecimiento y mantenimiento finales de la pluripotencia. Por tanto, puede someterse a prueba el efecto de añadir Nanog en una etapa posterior del procedimiento de reprogramación.

10 Además, puede someterse a prueba el tratamiento secuencial de microARN y proteínas y comparar la eficiencia de reprogramación con las de cada tratamiento o tratamiento simultáneo. Esta reprogramación temporalmente regulada es viable debido a una característica única del dispositivo microfluídico y puede ser importante optimizar adicionalmente la reprogramación de proteínas. La eficiencia de reprogramación puede calcularse dividiendo el número de colonias en el día 28 entre el número de células HF tratadas. Una vez completado, puede usarse un análisis de regresión para deducir la importancia relativa de cada factor de reprogramación, su concentración óptima, frecuencia/tiempo de administración óptimo y, como resultado, el protocolo óptimo para generar iPSC. La capacidad para controlar la cantidad y el tiempo de administración de proteínas en cada célula puede arrojar luz sobre la importancia funcional de cada factor en el procedimiento de reprogramación, potenciando de ese modo

20 adicionalmente la comprensión del procedimiento de reprogramación celular y el establecimiento de pluripotencia. Además, los resultados de este trabajo pueden usarse para mejorar adicionalmente el diseño del dispositivo para cumplir las demandas específicas de reprogramación y permitir el desarrollo final de versiones clínicamente aplicables.

25 Usando del procedimiento de reprogramación de proteínas optimizado tal como se describió anteriormente, puede aplicarse el protocolo de manera general a células adultas de fibroblastos humanos específicas de paciente. Dado que se han estudiado la diferenciación eficiente de ESC e iPSC en neuronas dopaminérgicas funcionales y los efectos de trasplante, es posible generar iPSC o líneas de iPSC a partir de fibroblastos humanos derivados a partir de pacientes con Parkinson. Una vez generadas y caracterizadas líneas de iPSC, se induce que se diferencien para dar neuronas dopaminérgicas y se caracterizan sus propiedades celulares, moleculares, fisiológicas y electrofisiológicas. Se someten a prueba las neuronas dopaminérgicas para determinar la funcionalidad *in vivo* tras el trasplante en modelos animales de enfermedad de Parkinson tales como los ratones con afaquia de modelo de PD genético.

30 Puede usarse la administración de proteínas basada en microfluidos para la conversión directa de células, por ejemplo, la conversión directa de fibroblastos en otros tipos de células tales como neuronas funcionales, hepatocitos y células sanguíneas. En el pasado, las manipulaciones usaban la expresión viral de factores de transcripción clave, provocando mutaciones génicas y alteraciones cromosómicas significativas, destacando así la necesidad de desarrollar métodos de conversión no virales, sin integración en el genoma, tales como administración directa de proteínas usando los métodos descritos en este caso. Por tanto, el dispositivo puede usarse para la administración de proteínas basada en microfluidos para la conversión directa de células. Dado que la expresión en mamíferos de determinados factores de transcripción resulta algunas veces desafiante, puede ser más viable someter a prueba la conversión mediante uno o dos factores de proteínas. Sin embargo, es posible convertir fibroblastos en otro destino celular usando un único factor, por ejemplo, Oct4 o Sox2, para generar precursores de sangre o neuronales, respectivamente. Estas proteínas ya están disponibles en una forma purificada para conversiones de células usando la administración de proteínas basada en microfluidos.

35

40

45

La figura 44 es un gráfico de barras que ilustra el silenciamiento de GFP en HESC tal como se midió mediante intensidad de GFP 48 horas tras el tratamiento con secuencias de ARNip activo y controles reorganizados al azar usando el dispositivo microfluídico y métodos relacionados. Las figuras 45A y 45B son dos representaciones gráficas que ilustran la intensidad de colorante y la viabilidad de células madre embrionarias humanas tras la administración de un colorante azul de 3 kDa.

50

Otras realizaciones están dentro del alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas. Por ejemplo, debido a la naturaleza de software, las funciones descritas anteriormente pueden implementarse usando software, hardware, firmware, cableado o combinaciones de cualquiera de éstos. Las características que implementan funciones también pueden estar físicamente ubicadas en diversas posiciones, incluyendo estar distribuidas de tal manera que porciones de funciones se implementan en ubicaciones físicas diferentes.

55

**REIVINDICACIONES**

1. Sistema microfluídico para provocar perturbaciones en una membrana celular de una célula para administrar una carga útil de manera intracelular, comprendiendo el sistema:
 

5 un canal microfluídico que define una luz que permite que pase a través una célula suspendida en un tampón, en el que el canal microfluídico incluye un estrechamiento de deformación de célula que provoca dichas perturbaciones, en el que un diámetro del estrechamiento es del 20-99% del diámetro de la célula, y en el que el diámetro del estrechamiento induce perturbaciones en la membrana celular lo suficientemente grandes como para que una carga útil pase a través.

10
2. Sistema microfluídico según la reivindicación 1, en el que el diámetro del estrechamiento también reduce una probabilidad de que la célula muera como resultado de la deformación.
- 15 3. Sistema microfluídico según la reivindicación 1 ó 2, en el que el diámetro del estrechamiento es del 20% al 60% del diámetro de la célula.
4. Sistema microfluídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el estrechamiento incluye una porción de entrada, un punto central y una porción de salida.
- 20 5. Sistema microfluídico según la reivindicación 4, en el que
 

la porción de entrada define un ángulo de estrechamiento, y el ángulo de estrechamiento está optimizado para reducir la obstrucción del canal o para mejorar la administración y viabilidad celular; o

25 la porción de entrada define un ángulo de estrechamiento de 90 grados.
6. Sistema microfluídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además una pluralidad de los canales microfluídicos dispuestos en serie y/o en paralelo.
- 30 7. Sistema microfluídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además un impulsor de células.
8. Sistema microfluídico según la reivindicación 7, en el que el impulsor de células se selecciona del grupo que consiste en: una bomba de presión, un cilindro de gas, un compresor, una bomba de vacío, una jeringa, una bomba de jeringa, una bomba peristáltica, una jeringa manual, una pipeta, un pistón, un accionador capilar, un corazón humano, músculo humano y la gravedad.
- 35 9. Sistema microfluídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que una sección transversal del canal microfluídico se selecciona del grupo que consiste en circular, elíptica, una hendidura alargada, cuadrada, hexagonal y triangular.
- 40 10. Método para administrar una carga útil en una célula, comprendiendo el método
 

45 proporcionar la célula en una disolución en suspensión;

hacer pasar la disolución a través de un canal microfluídico que incluye un estrechamiento de deformación de célula, en el que un diámetro del estrechamiento es del 20-99% del diámetro de la célula, en el que a medida que la célula pasa a través del estrechamiento se aplica una fuerza de deformación a la célula que provoca perturbaciones de la célula lo suficientemente grandes como para que la carga útil pase a través; e

50 incubar la célula en una disolución que contiene carga útil durante un tiempo predeterminado después de que pase a través del estrechamiento.
- 55 11. Método según la reivindicación 10, en el que la disolución en suspensión comprende una célula y la carga útil antes, durante y/o después de pasar a través del estrechamiento.
12. Método según la reivindicación 10 u 11, en el que el diámetro del estrechamiento es del 20% al 60% del diámetro de la célula.
- 60 13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que una sección transversal del canal microfluídico se selecciona del grupo que consiste en circular, elíptica, una hendidura alargada, cuadrada, hexagonal y triangular.
- 65 14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en el que hacer pasar la disolución incluye hacer pasar la disolución a través de una porción de entrada, un punto central y una porción de salida del

estrechamiento, en el que la porción de entrada define un ángulo de estrechamiento.

- 5
15. Método según la reivindicación 14, que comprende además reducir la obstrucción del canal microfluídico o mejorar la administración y viabilidad celular ajustando el ángulo de estrechamiento de la porción de entrada.
16. Método según la reivindicación 15, en el que la porción de entrada define un ángulo de estrechamiento de 90 grados.
- 10
17. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16, en el que hacer pasar la disolución incluye hacer pasar la disolución a través de una pluralidad de canales microfluídicos dispuestos en serie y/o en paralelo.
- 15
18. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17, en el que incubar la célula en una disolución que contiene carga útil incluye incubar la célula durante más de 0,0001 segundos, tal como durante de 0,0001 segundos a 60 minutos.
- 20
19. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 18, en el que la fuerza de deformación comprende compresión o compresión y cizalladura.
20. Método para administrar una carga útil en una célula, comprendiendo el método:
- proporcionar una célula en una disolución en suspensión;
- 25
- hacer pasar la célula a través de un estrechamiento de deformación de célula, en el que un diámetro del estrechamiento es del 20-99% del diámetro de la célula de tal manera que se aplica una fuerza de deformación a la célula a medida que pasa a través del estrechamiento, provocando así perturbaciones en una membrana de la célula lo suficientemente grandes como para que una carga útil pase a través; e
- 30
- incubar la célula en la disolución con una carga útil después de haberse deformado la célula.
21. Método según la reivindicación 20, en el que la disolución en suspensión comprende una célula y la carga útil antes, durante y/o después de pasar a través del estrechamiento.
- 35
22. Método según la reivindicación 20 ó 21, en el que el estrechamiento es del 20% al 60% del diámetro de la célula.
23. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, en el que hacer pasar la disolución incluye hacer pasar la disolución a través de una pluralidad de estrechamientos dispuestos en serie y/o paralelo.
- 40
24. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, en el que deformar la célula incluye deformar la célula durante de 1  $\mu$ s a 1 ms y/o en el que la incubación se produce durante de 0,0001 segundos a 20 minutos.
- 45
25. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 24, en el que la fuerza de deformación comprende compresión o compresión y cizalladura.
26. Método para administrar una carga útil en una célula, comprendiendo el método:
- 50
- proporcionar una suspensión de una célula y una carga útil;
- hacer fluir la suspensión a través de un estrechamiento de deformación de célula, en el que un diámetro del estrechamiento es del 20-99% del diámetro de la célula, para deformar de manera repentina y temporal la célula; e
- 55
- incubar la célula en la suspensión durante un tiempo predeterminado después de la deformación repentina y temporal.
27. Método según la reivindicación 26, en el que el estrechamiento se realiza en un canal microfluídico.
- 60
28. Método según la reivindicación 26 ó 27, en el que el diámetro del estrechamiento es del 20% al 60% del diámetro de la célula.
29. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28, en el que hacer fluir la suspensión a través del estrechamiento en el canal microfluídico deforma la célula durante sustancialmente de 1  $\mu$ s a 1 ms.
- 65

30. Sistema microfluídico para su uso con una célula suspendida en una disolución y para provocar perturbaciones en una membrana de la célula, comprendiendo el sistema:
- 5 un estrechamiento de deformación de célula, en el que un diámetro del estrechamiento es del 20-99% del diámetro de la célula para deformar de manera repentina y temporal la célula, en el que el estrechamiento provoca perturbaciones en la membrana de la célula, en el que las perturbaciones son lo suficientemente grandes como para que una carga útil pase a través.
- 10 31. Sistema microfluídico según la reivindicación 30, en el que el estrechamiento es del 20% al 60% del diámetro de la célula.
32. Sistema microfluídico según la reivindicación 30 ó 31, en el que el sistema está configurado para provocar una deformación repentina y temporal de la célula, que usa:
- 15 (i) un canal microfluídico;
- (ii) una pluralidad de micropilares configurados en una matriz;
- 20 (iii) una o más placas móviles; o
- (iv) materiales de carga.
33. Sistema microfluídico según una cualquiera de las reivindicaciones 30 a 32, en el que la célula se deforma durante de 1  $\mu$ s a 1 ms.
- 25 34. Métodos según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 29, en los que el método se usa para administrar:
- 30 (i) ADN, ARN, ARNip, proteínas o macromoléculas marcadas a fibroblastos primarios y células madre para reprogramación celular;
- (ii) antígeno, macromoléculas marcadas, péptidos o ARN a células inmunitarias primarias;
- 35 (iii) al menos uno de puntos cuánticos, compuestos fluorescentes y nanotubos de carbono a una célula diana para ayudar en la obtención de imágenes de la célula diana; o
- (iv) fármacos a una célula tumoral.

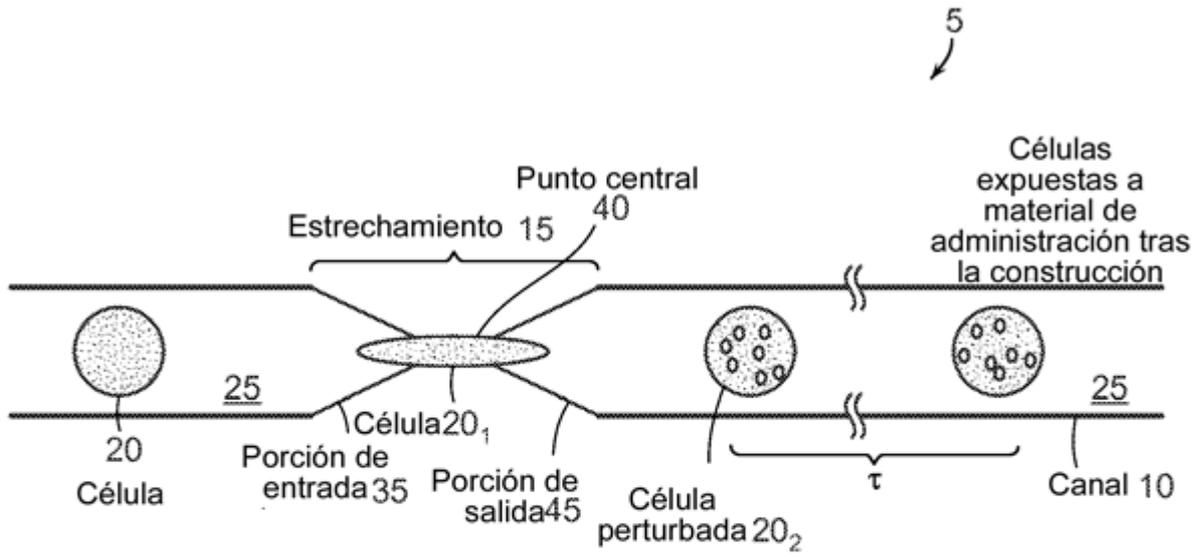


FIG. 1A

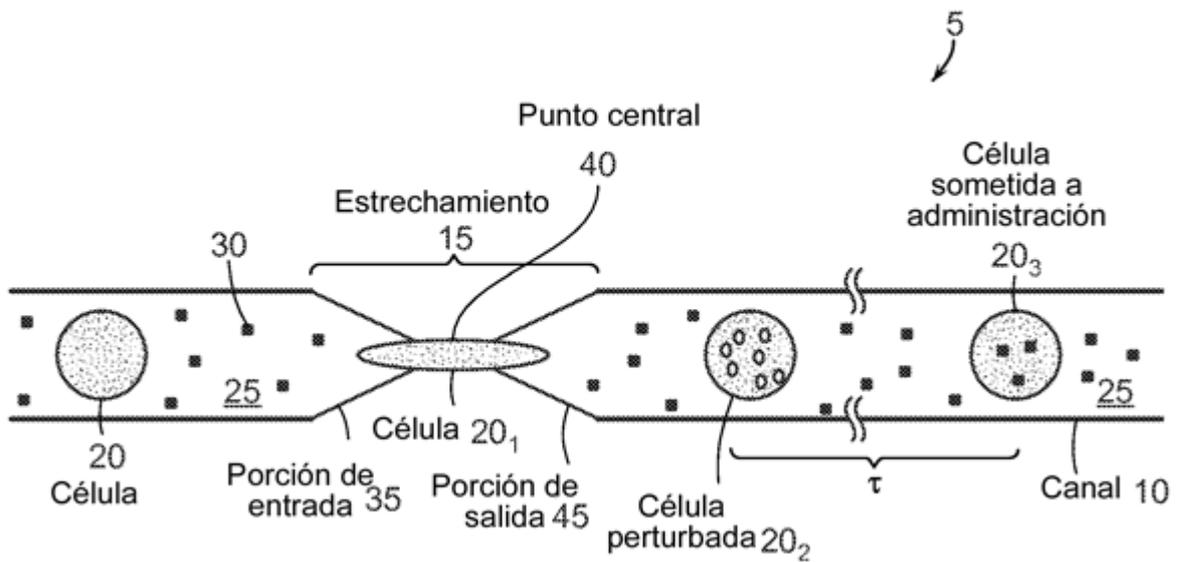


FIG. 1B

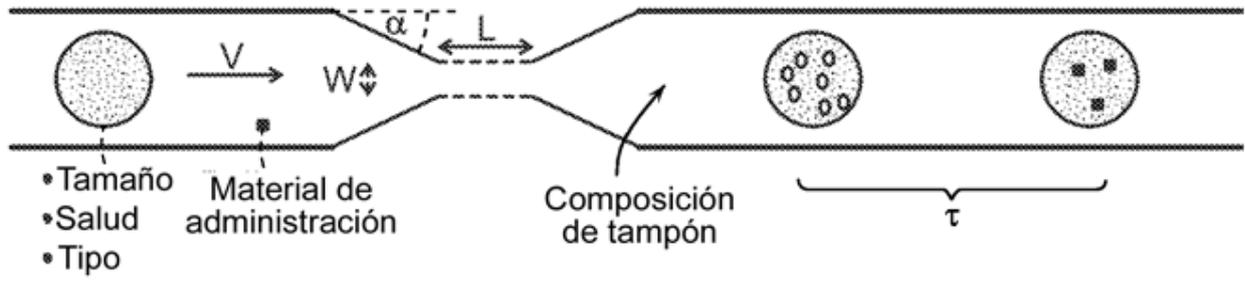


FIG. 2A

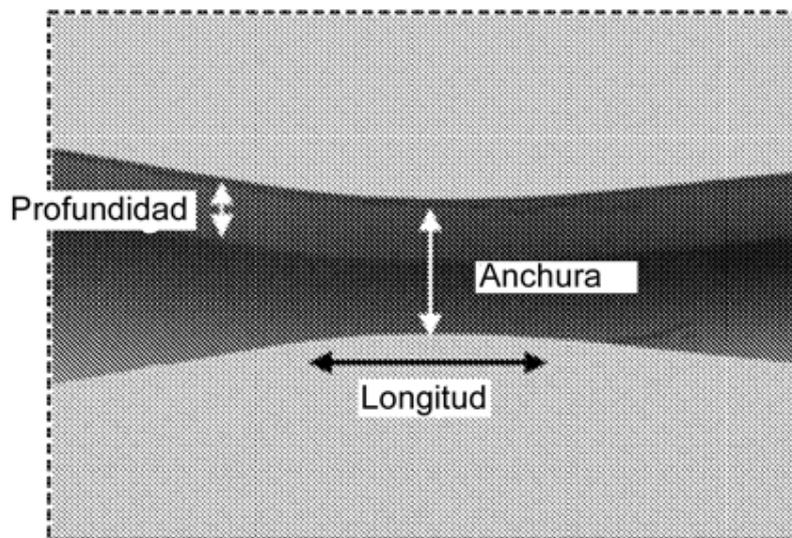


FIG. 2B

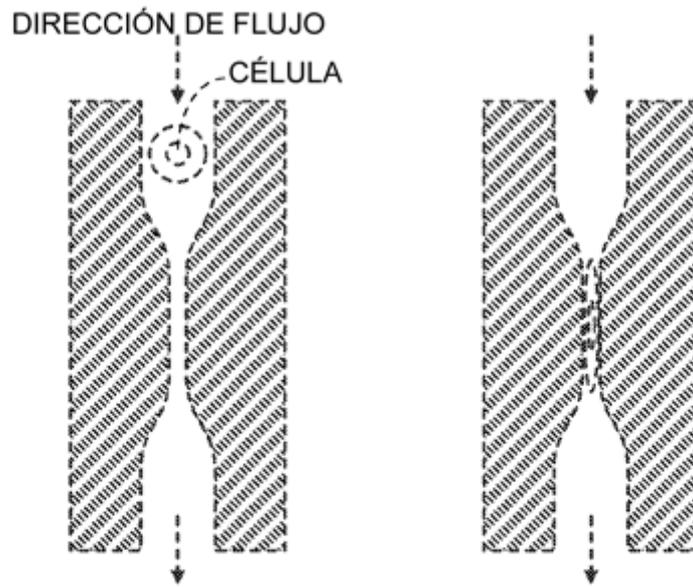


FIG. 3

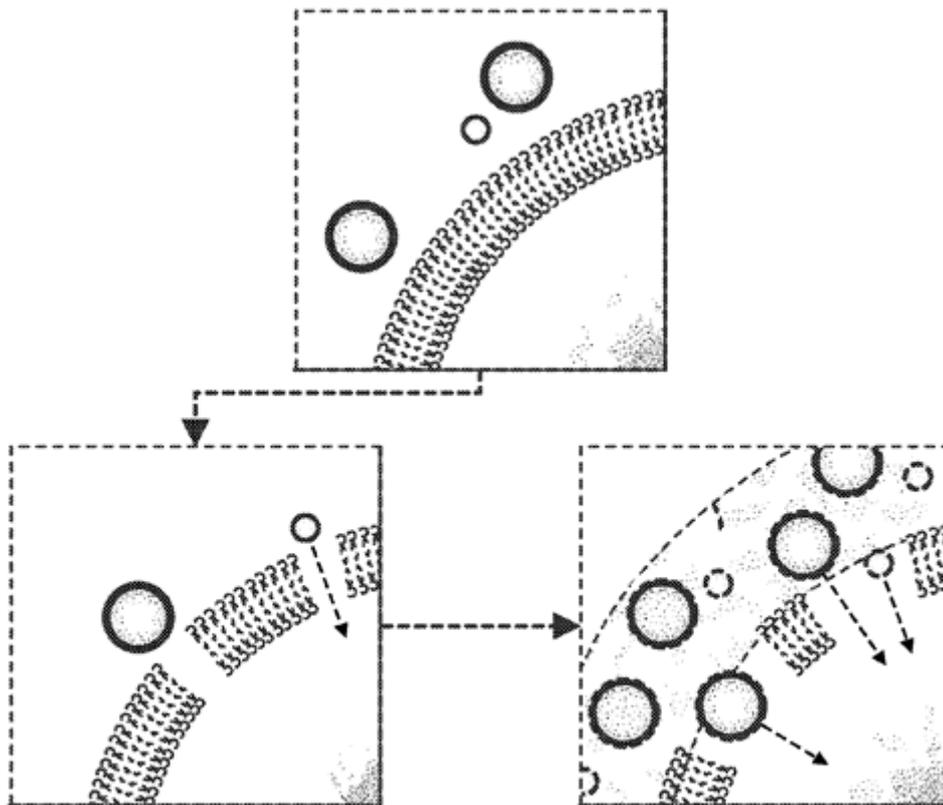


FIG. 4

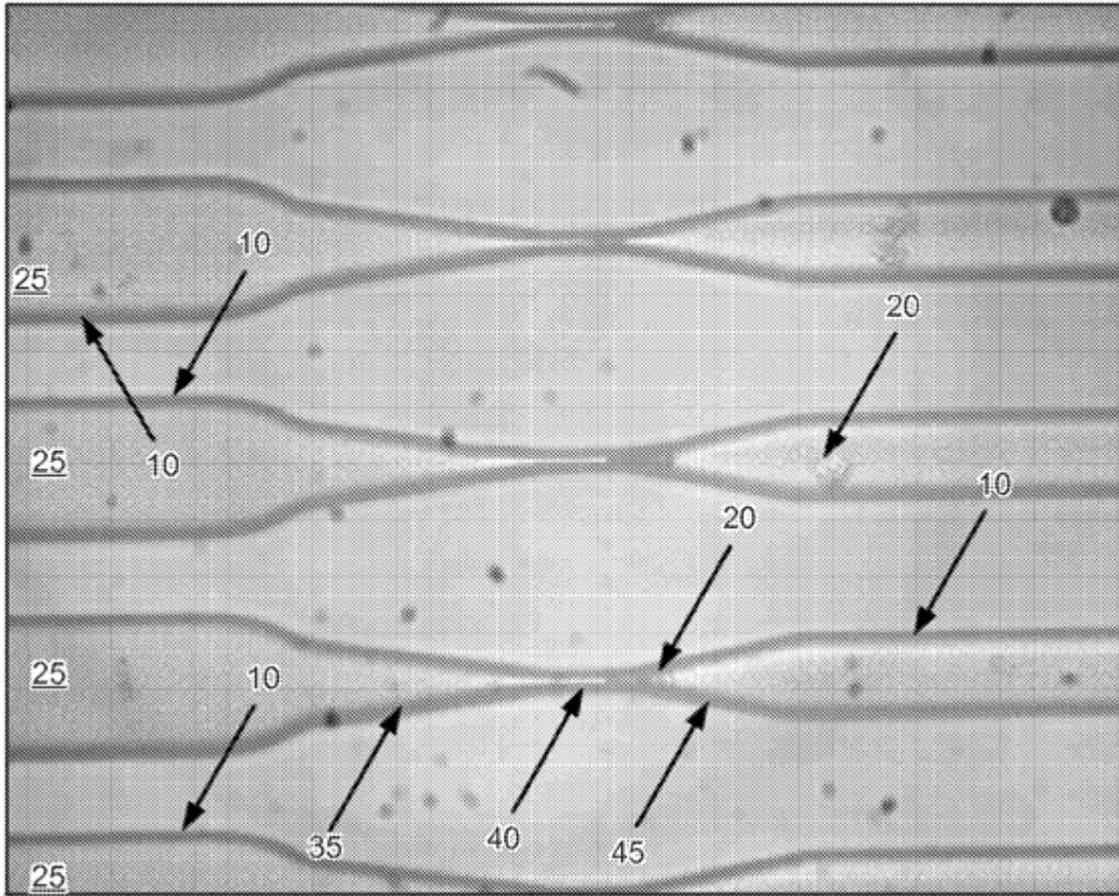


FIG. 5

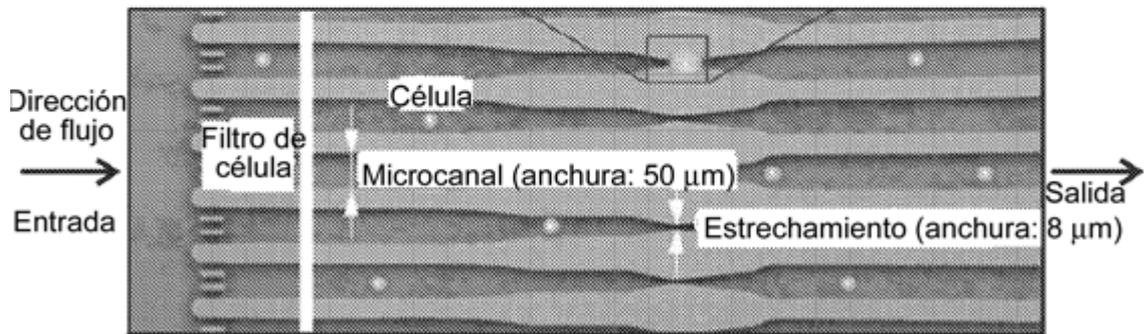


FIG. 6

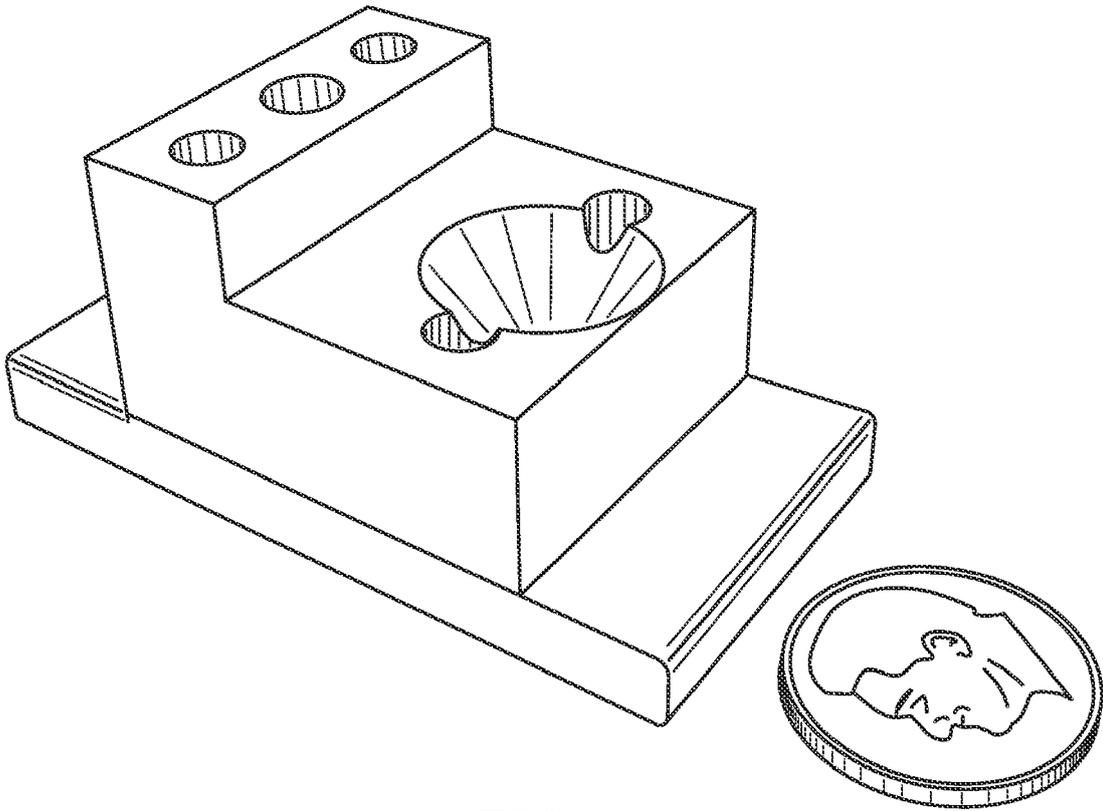


FIG. 7

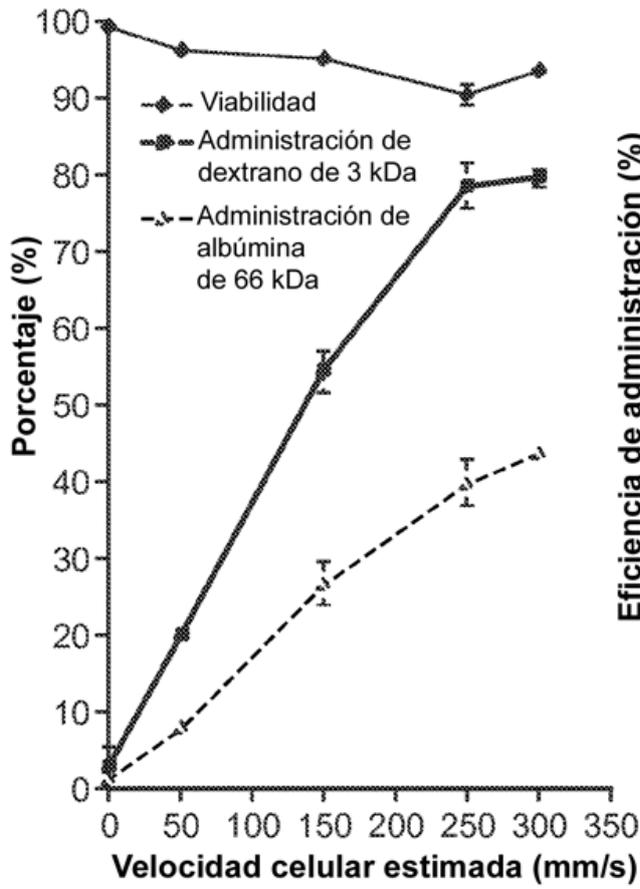


FIG. 8A

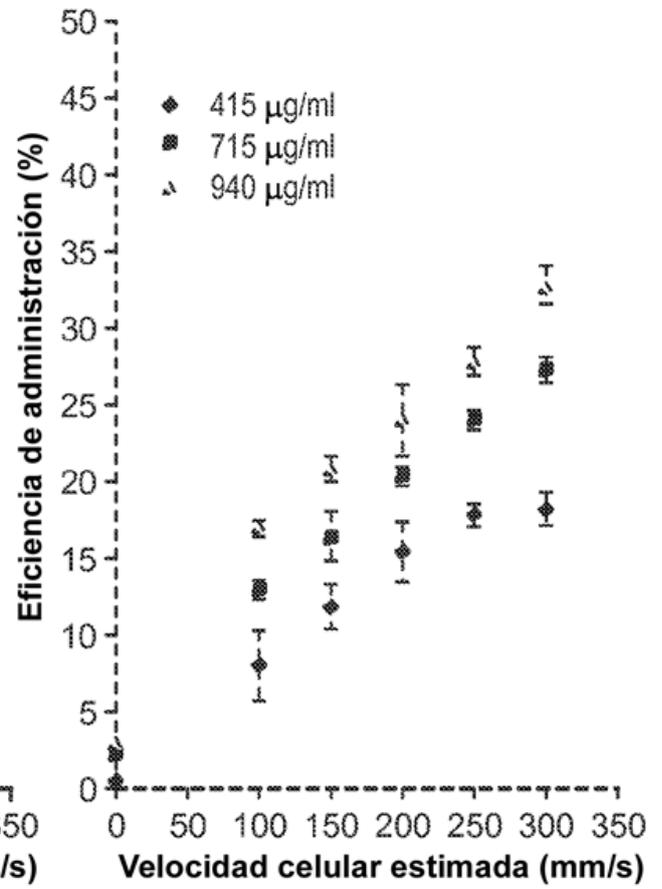


FIG. 8B

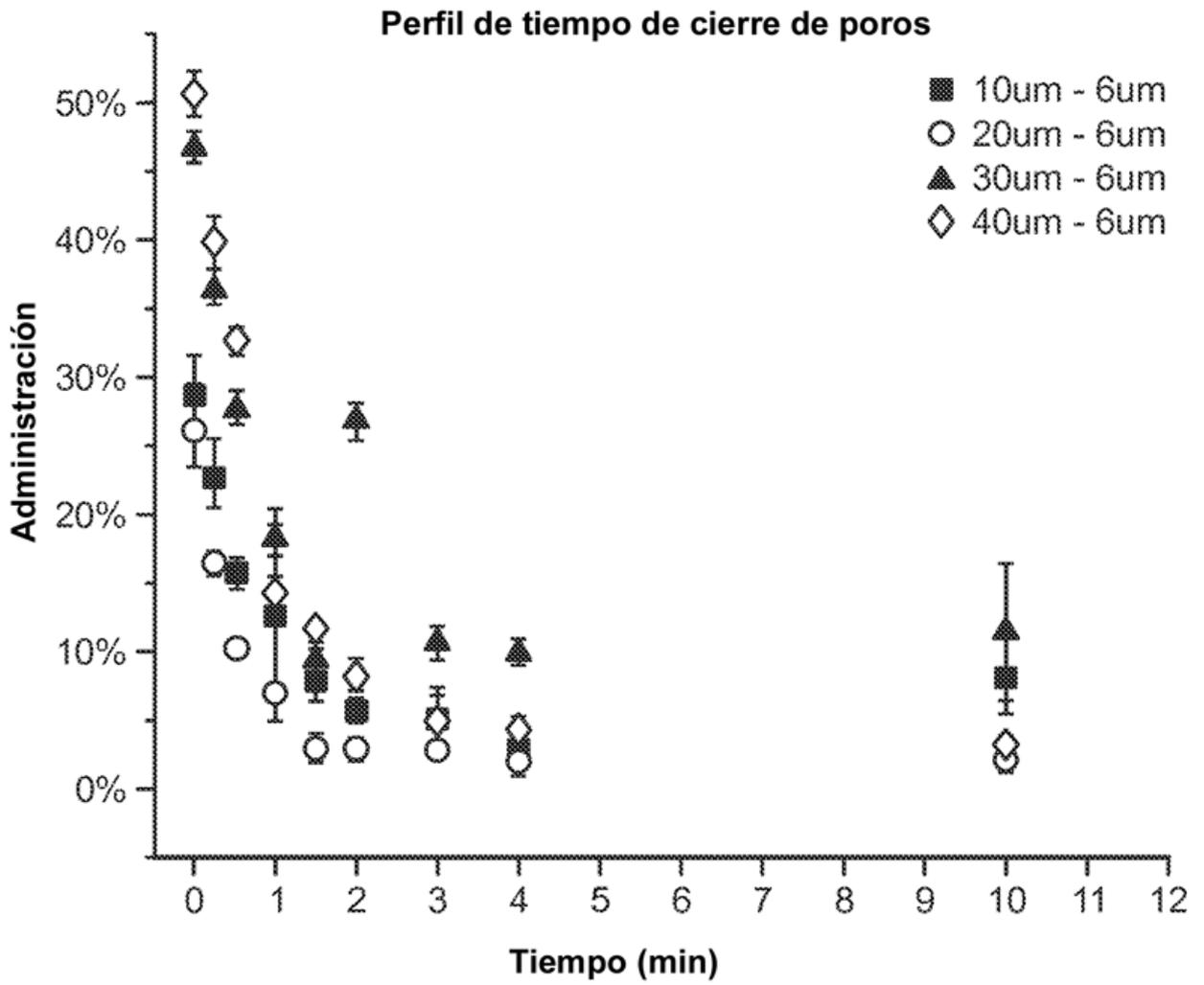


FIG. 9

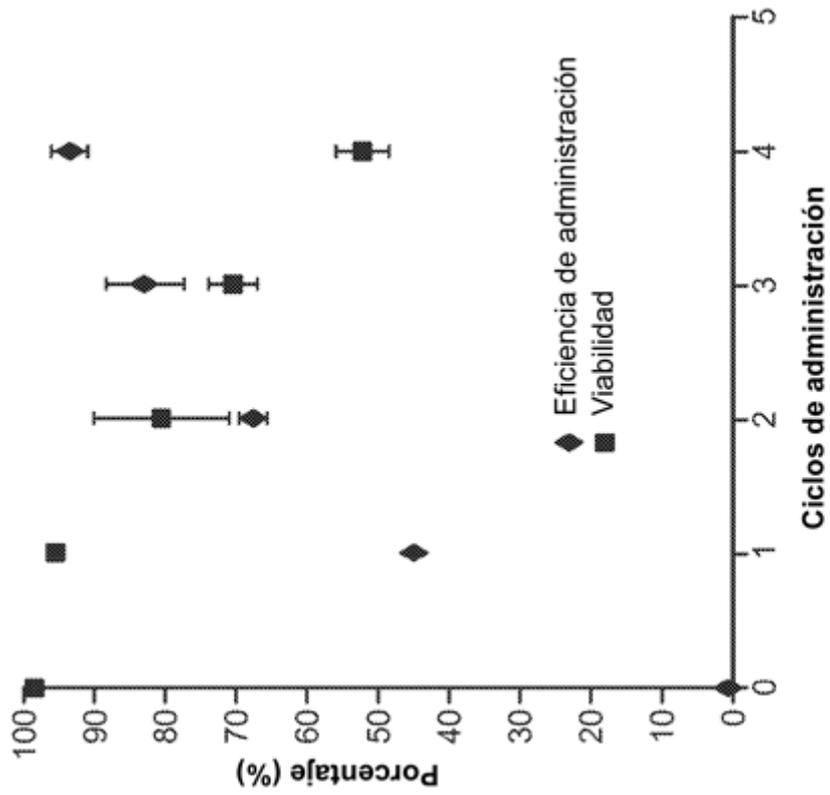


FIG. 10

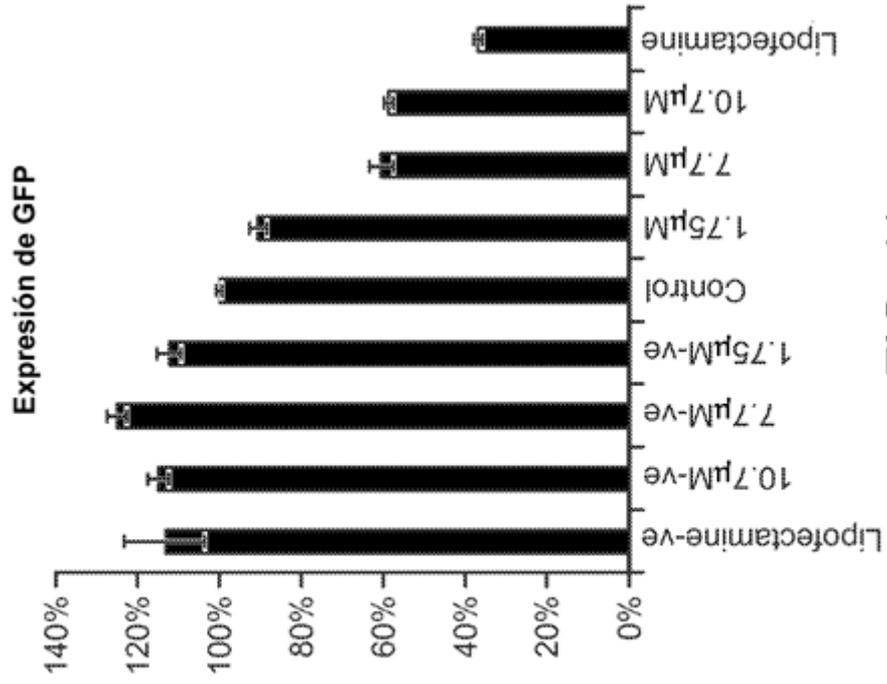
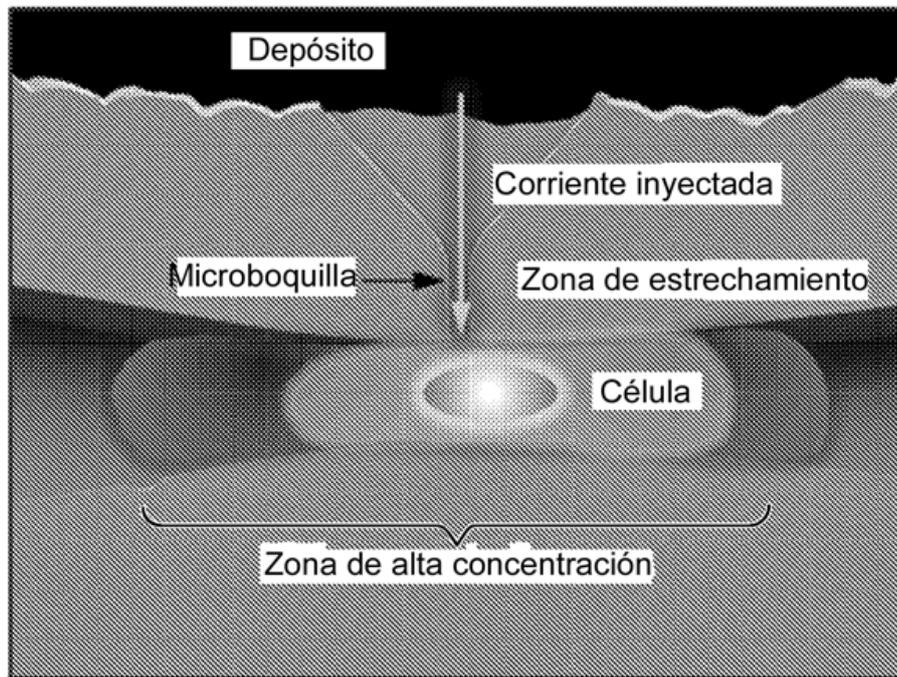


FIG. 11



Mag= 3.62 K X 20µm WD= 4mm EHT= 1.19 kV Señal A = SE2 Fecha: 15 de oct. de 2010 Hora: 15:26:03  
SUPRA 40-25-92 ←————→ Reducción de ruido = prom. de tramas

FIG. 12

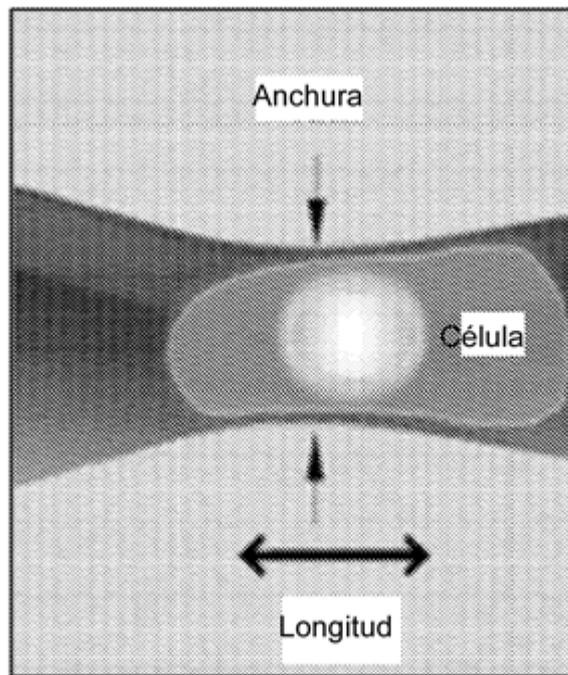
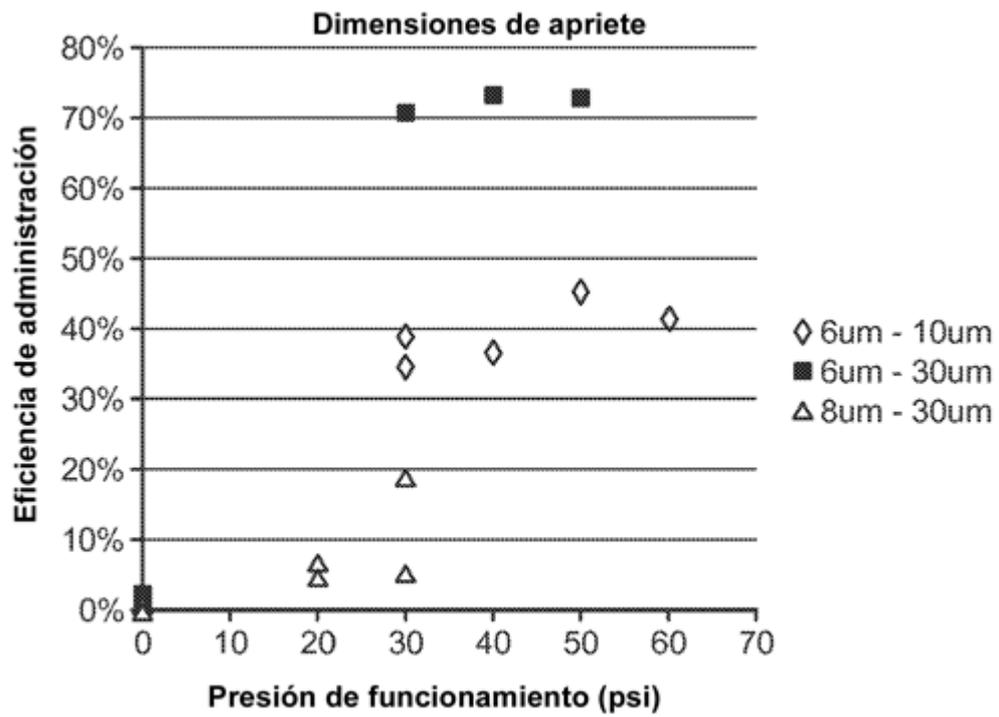


FIG. 13

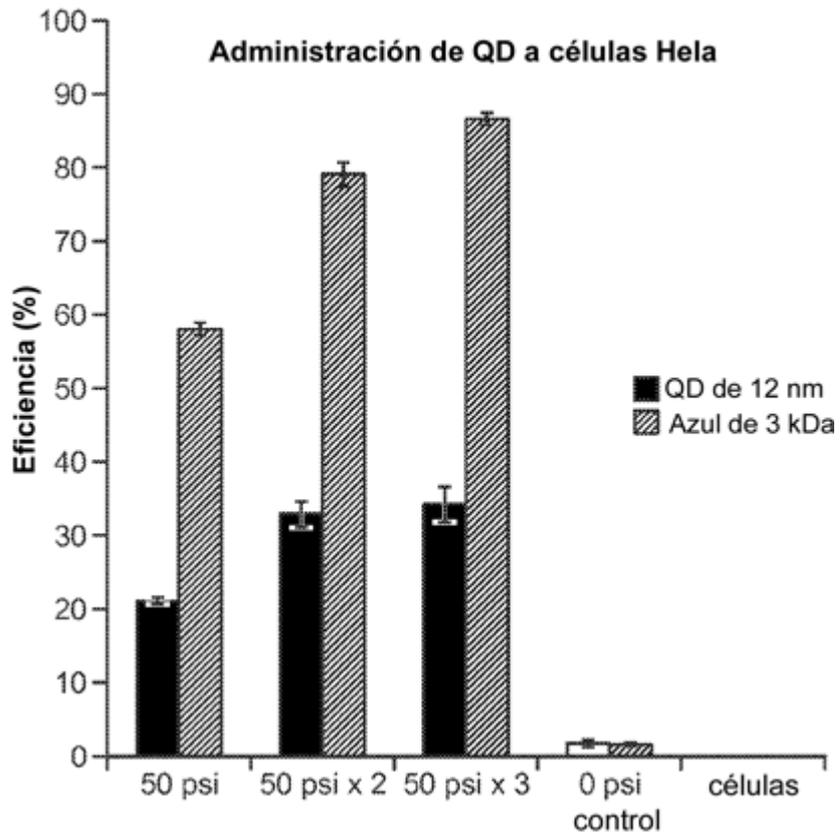


FIG. 14

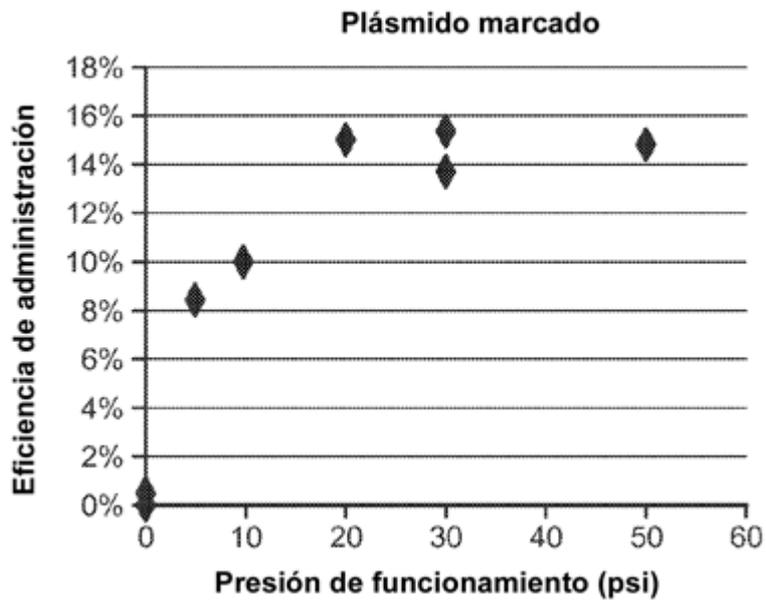


FIG. 15

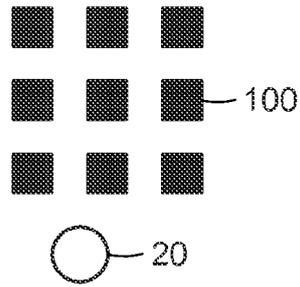


FIG. 16A

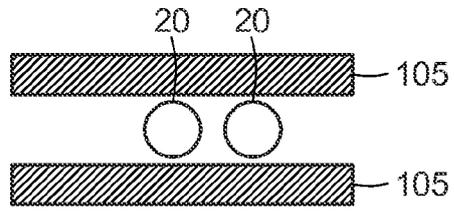


FIG. 16B

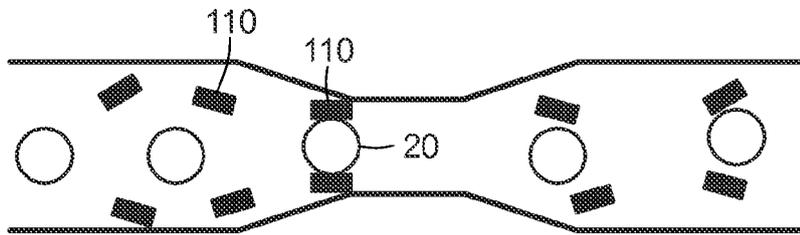


FIG. 16C

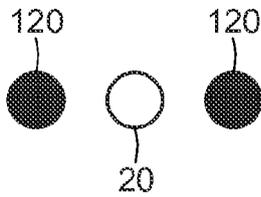


FIG. 16D

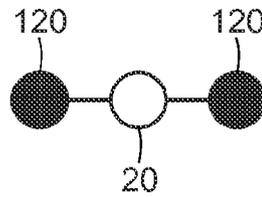


FIG. 16E

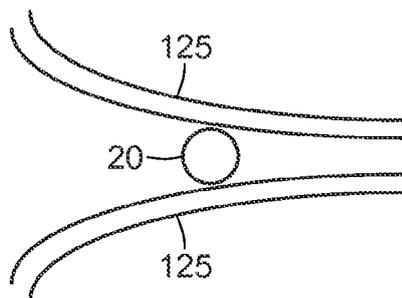


FIG. 16F

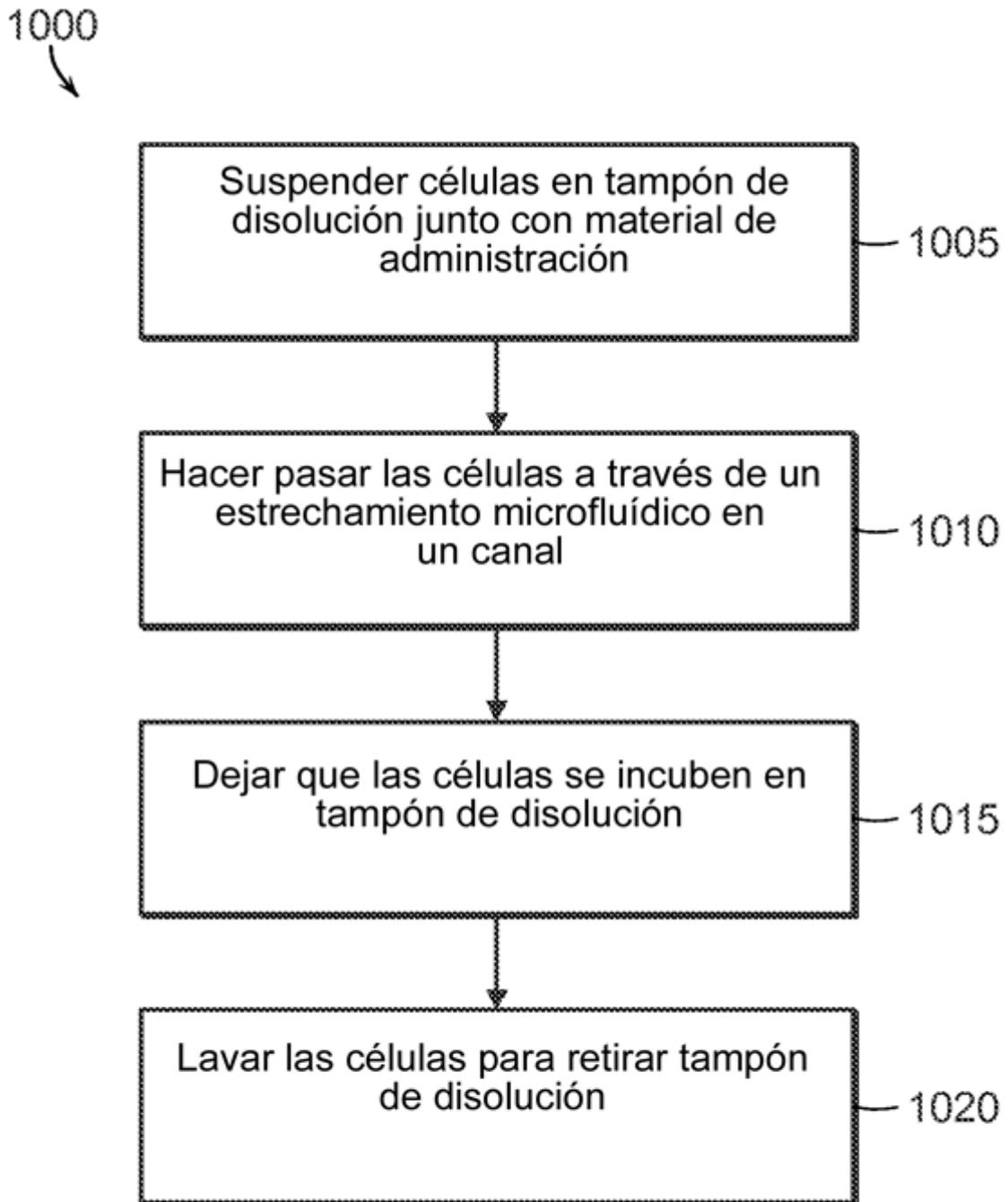


FIG. 17

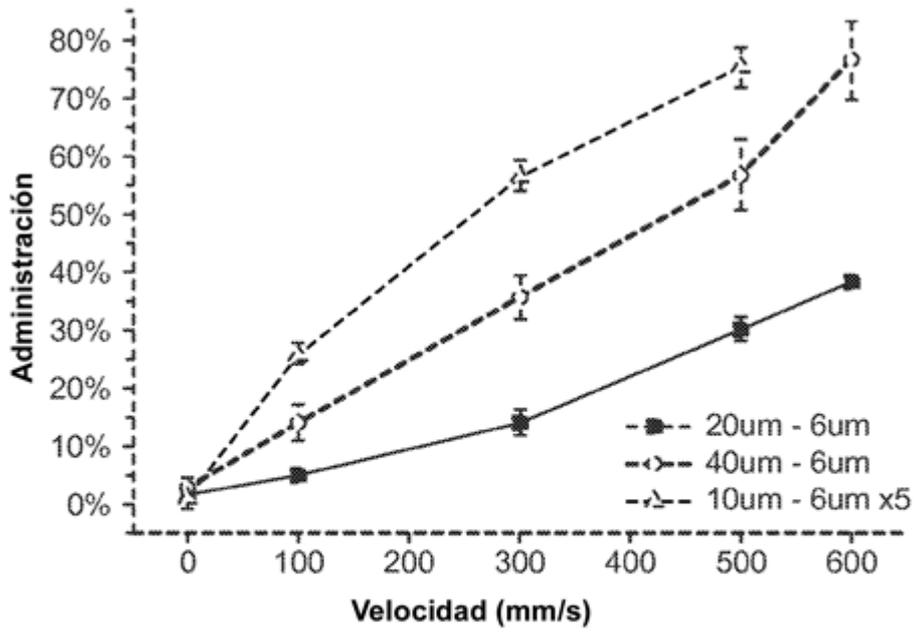


FIG. 18A

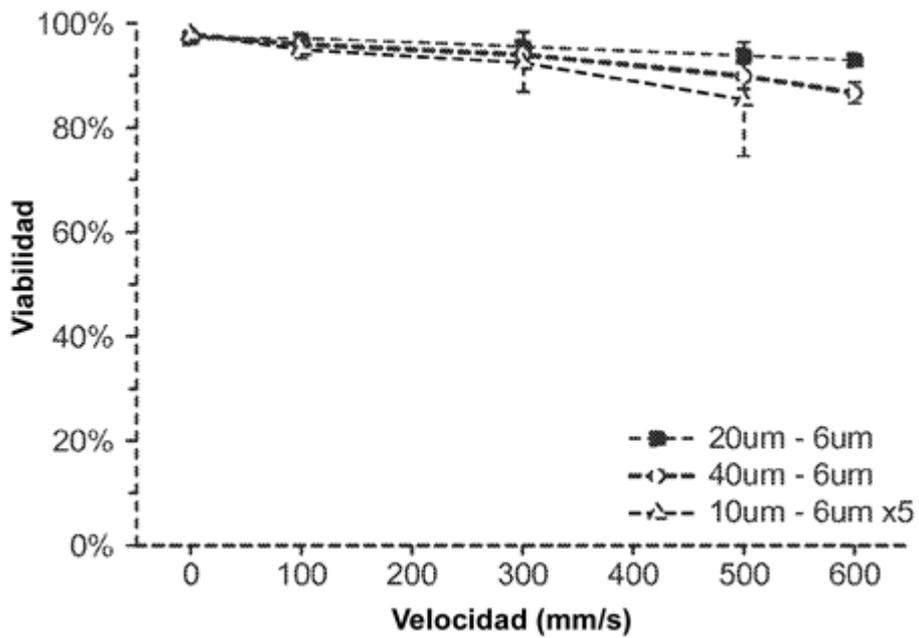


FIG. 18B

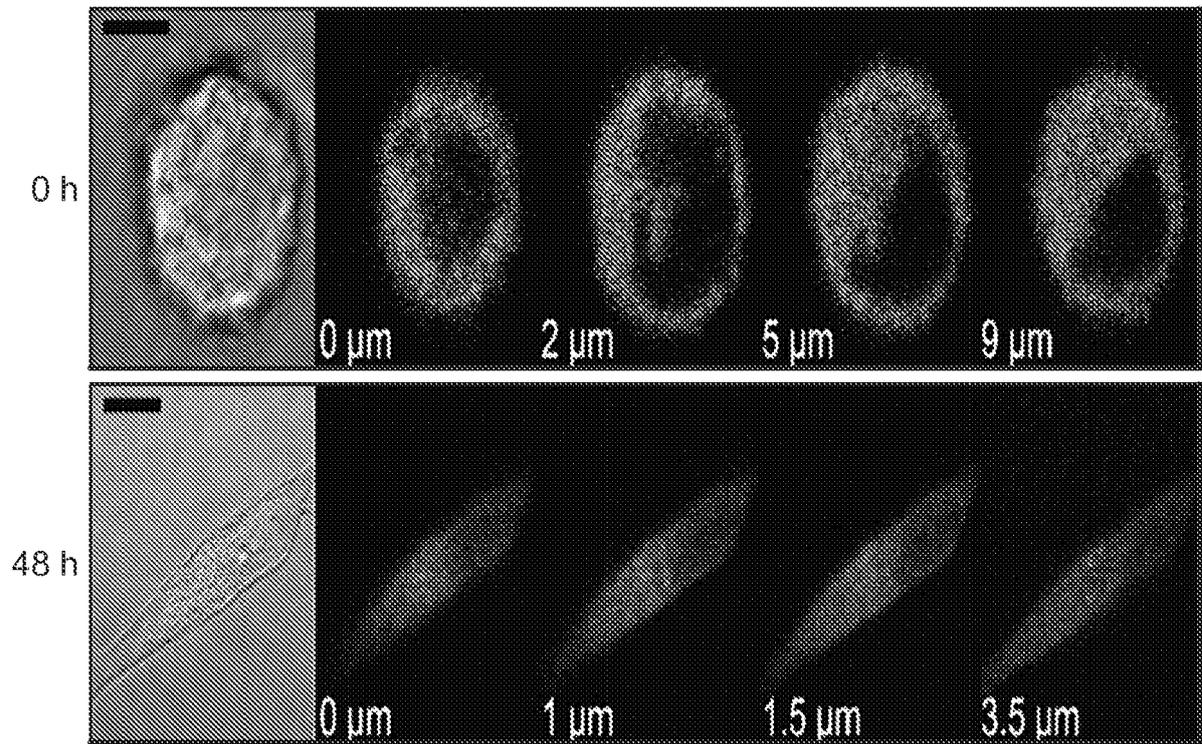


FIG. 19

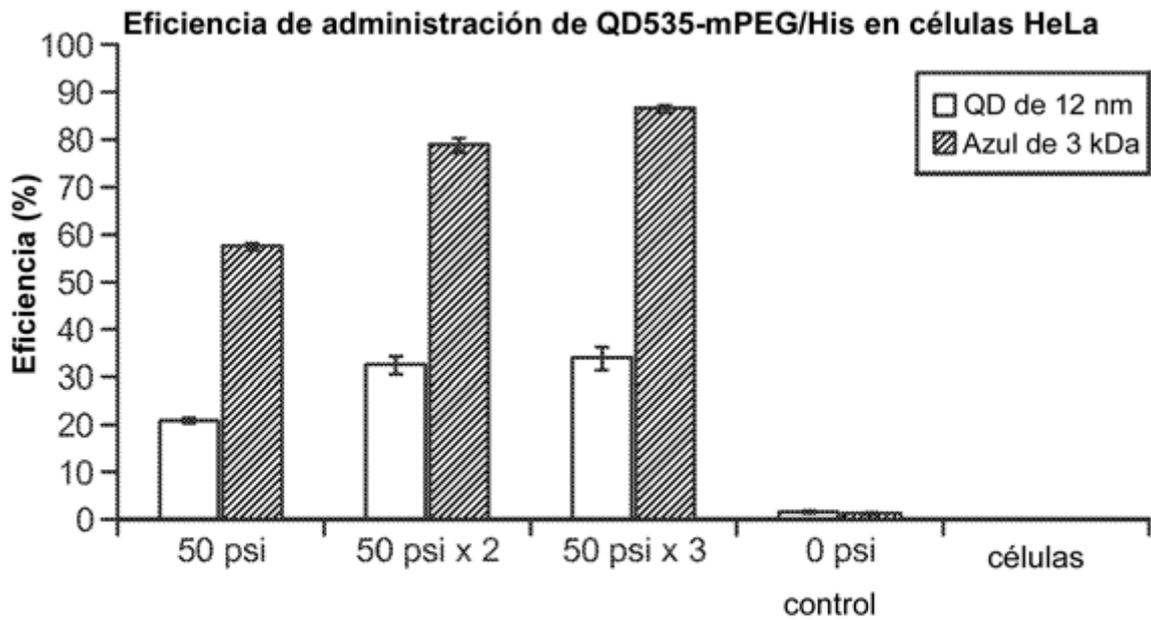


FIG. 20A

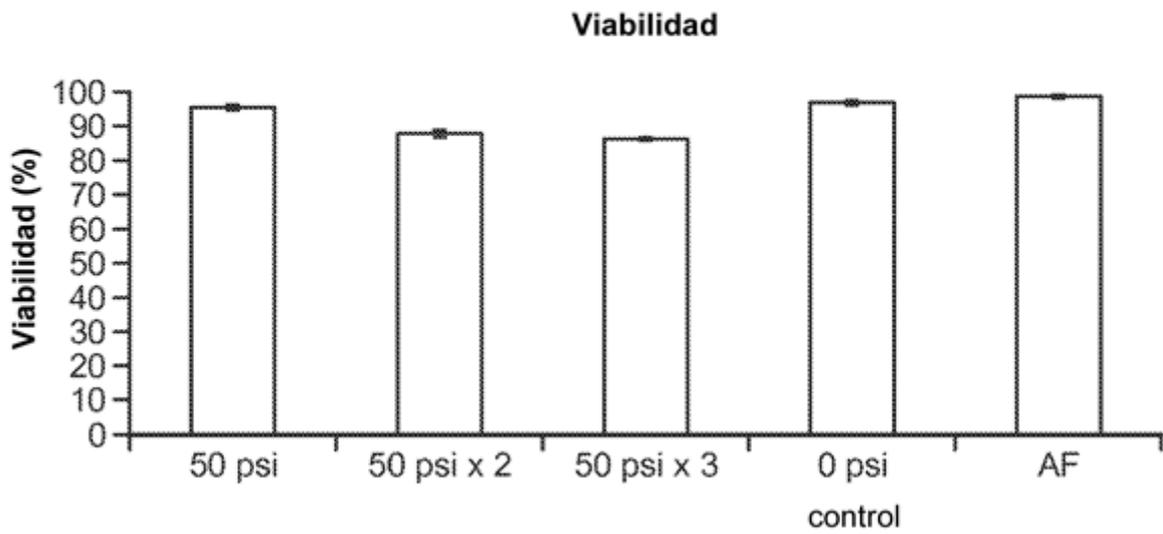


FIG. 20B

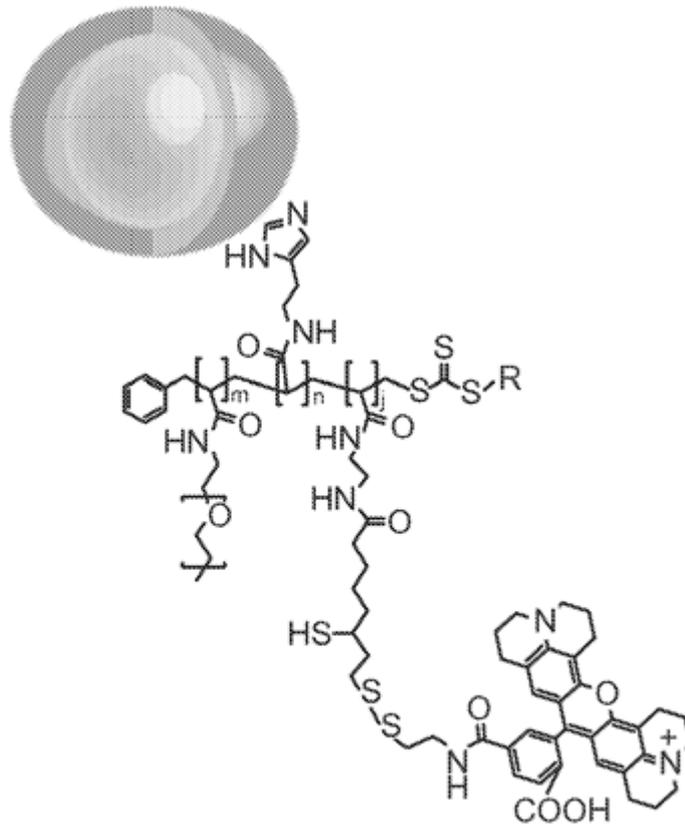
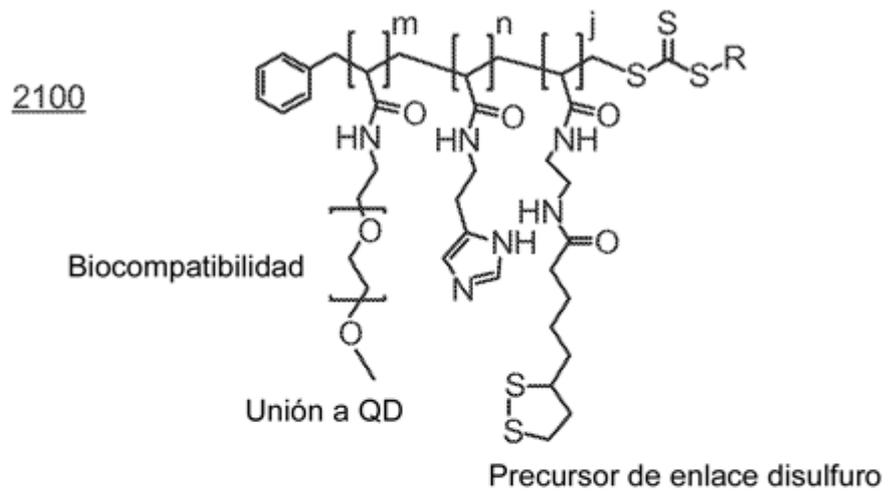


FIG. 21A

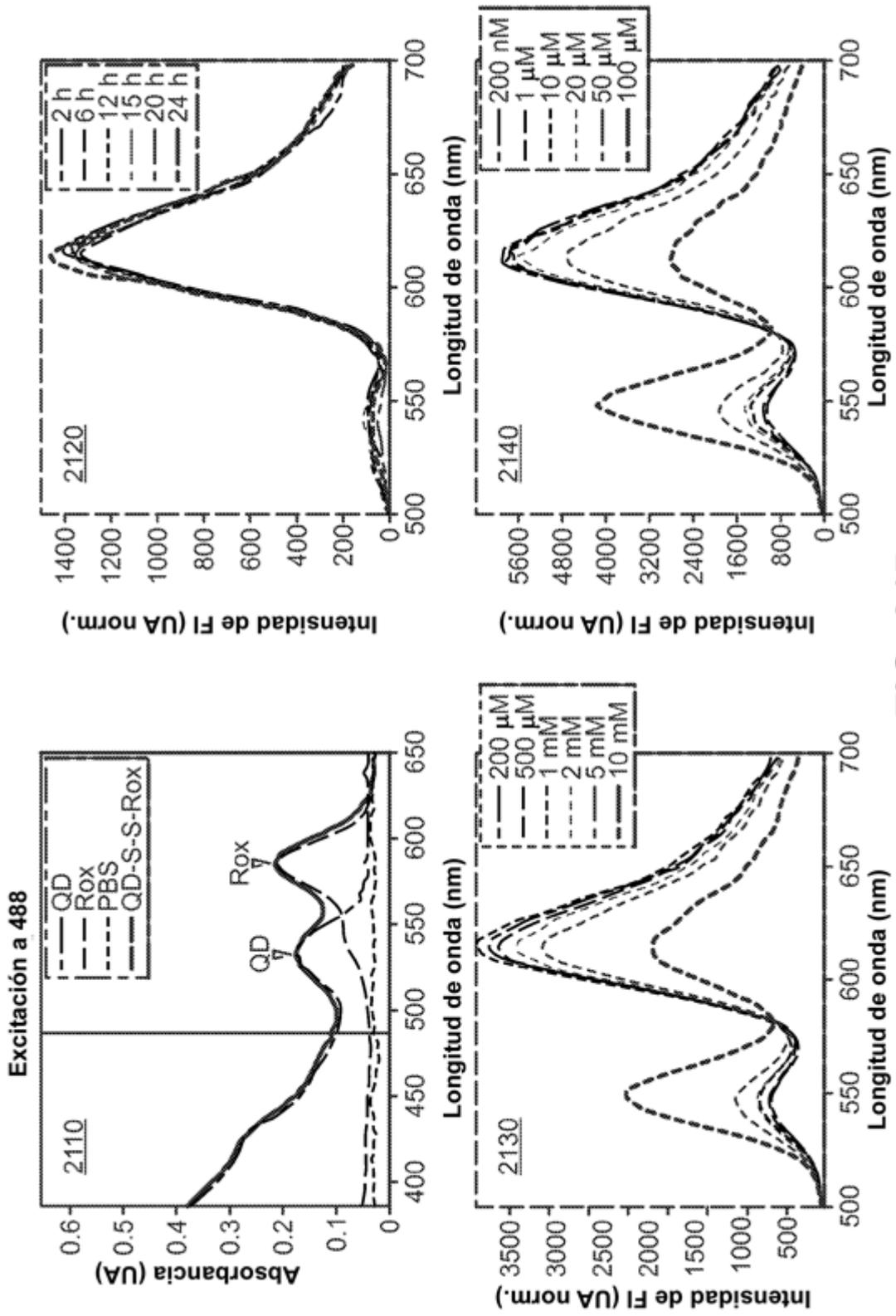
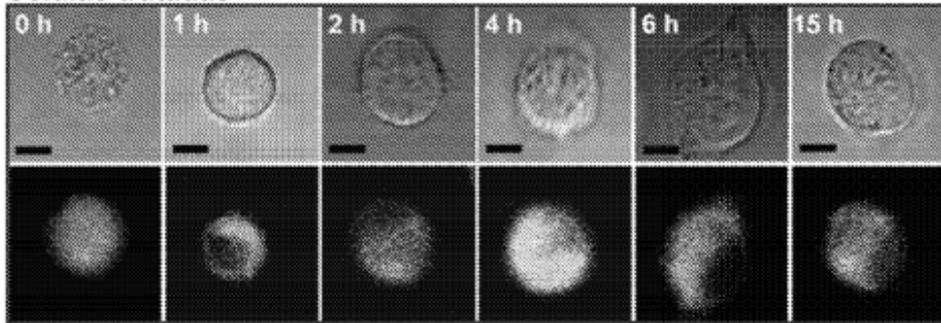
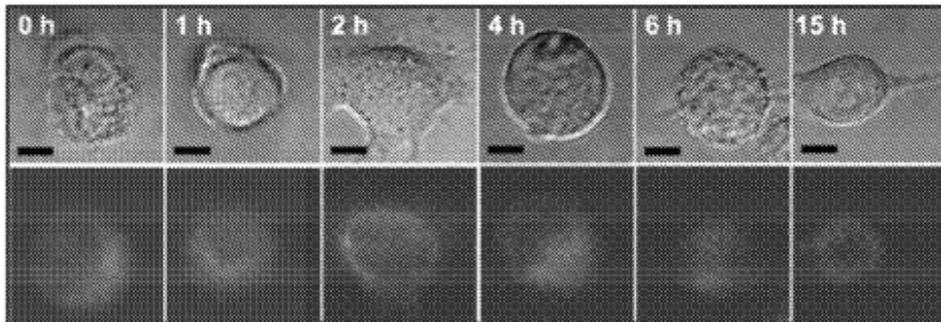


FIG. 21B

**Células tratadas**

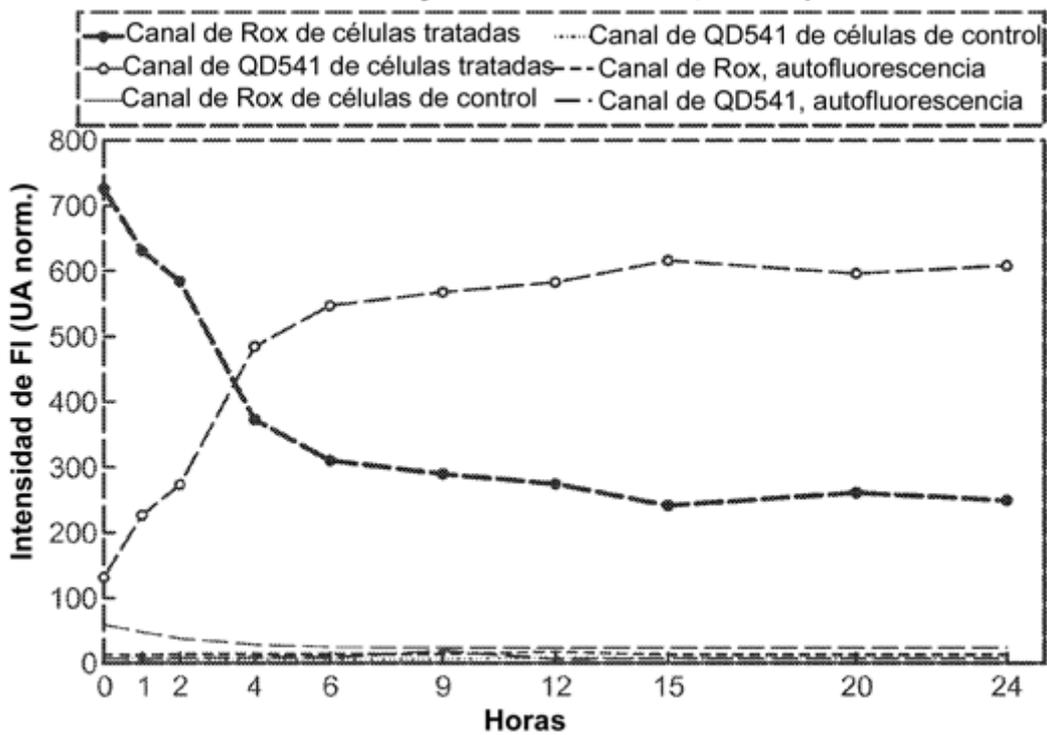


**Células de control**



**FIG. 22A**

**Intensidades de QD541 y Rox normalizadas, media por célula**



**FIG. 22B**

2300

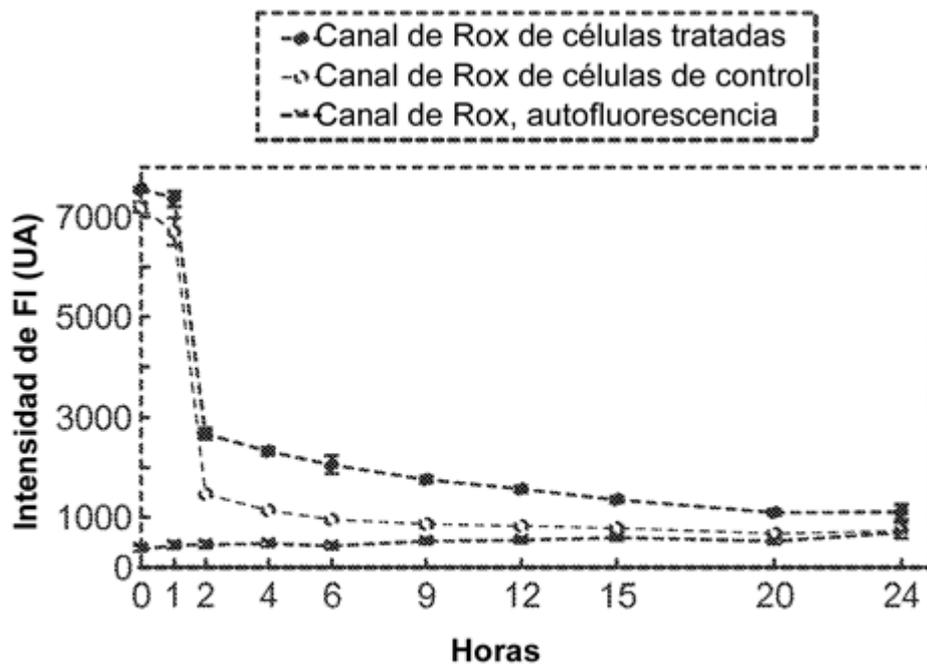
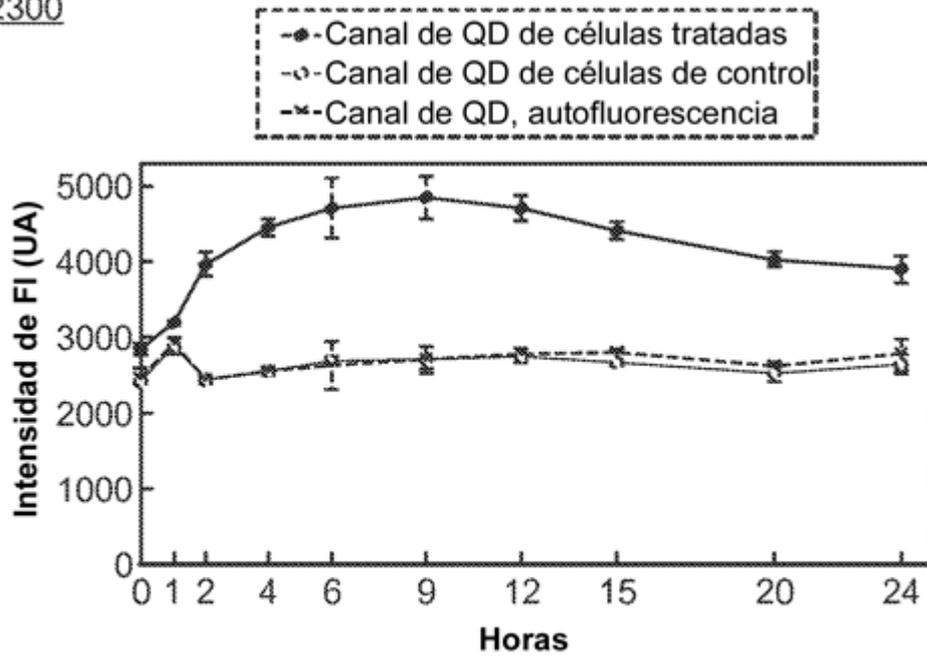
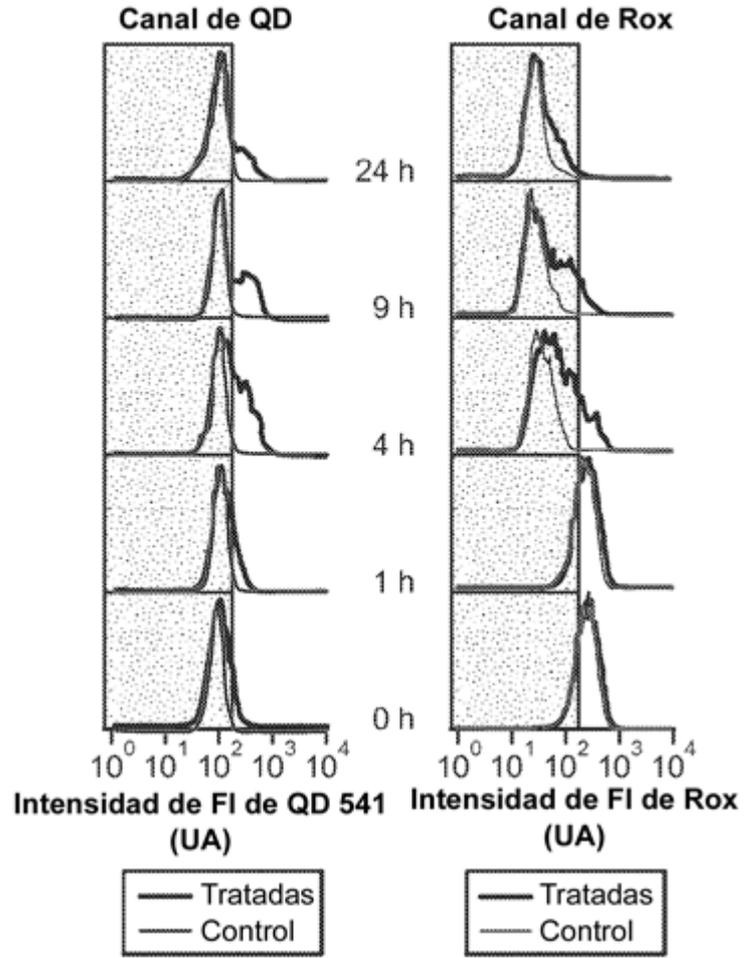


FIG. 23A

2310



2320

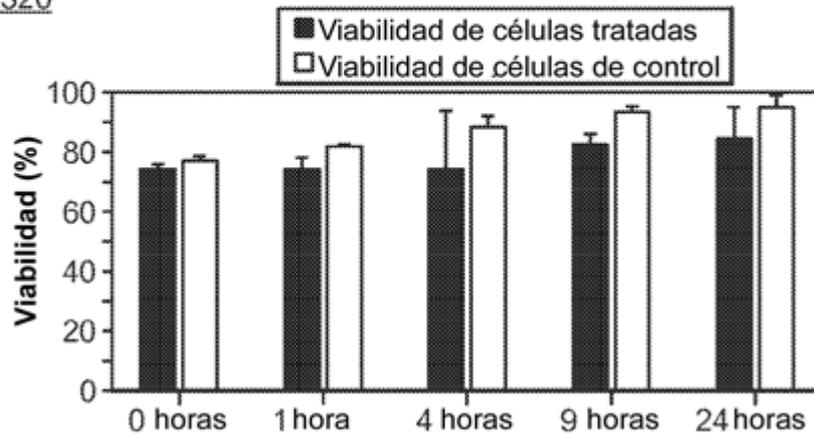


FIG. 23B

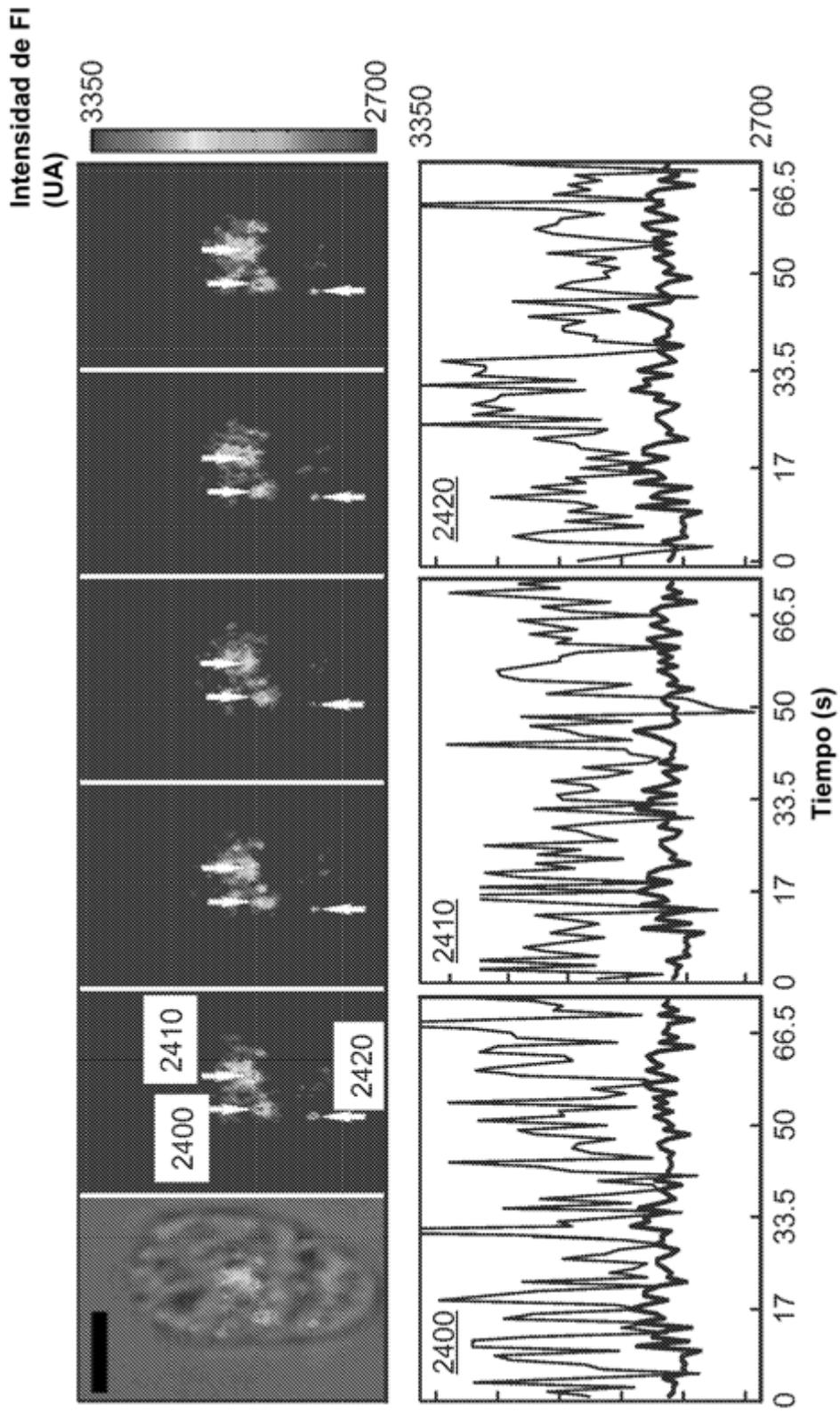


FIG. 24

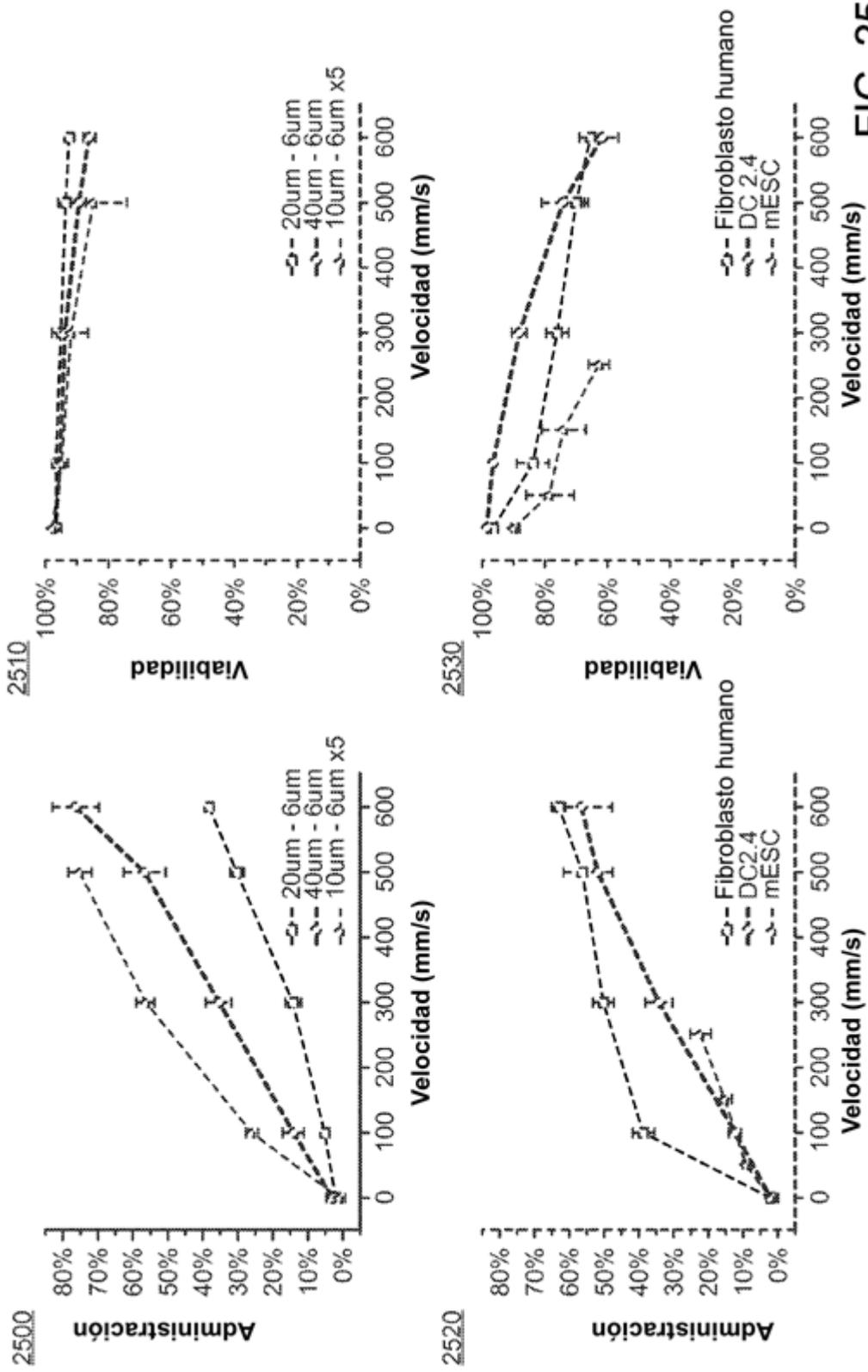


FIG. 25

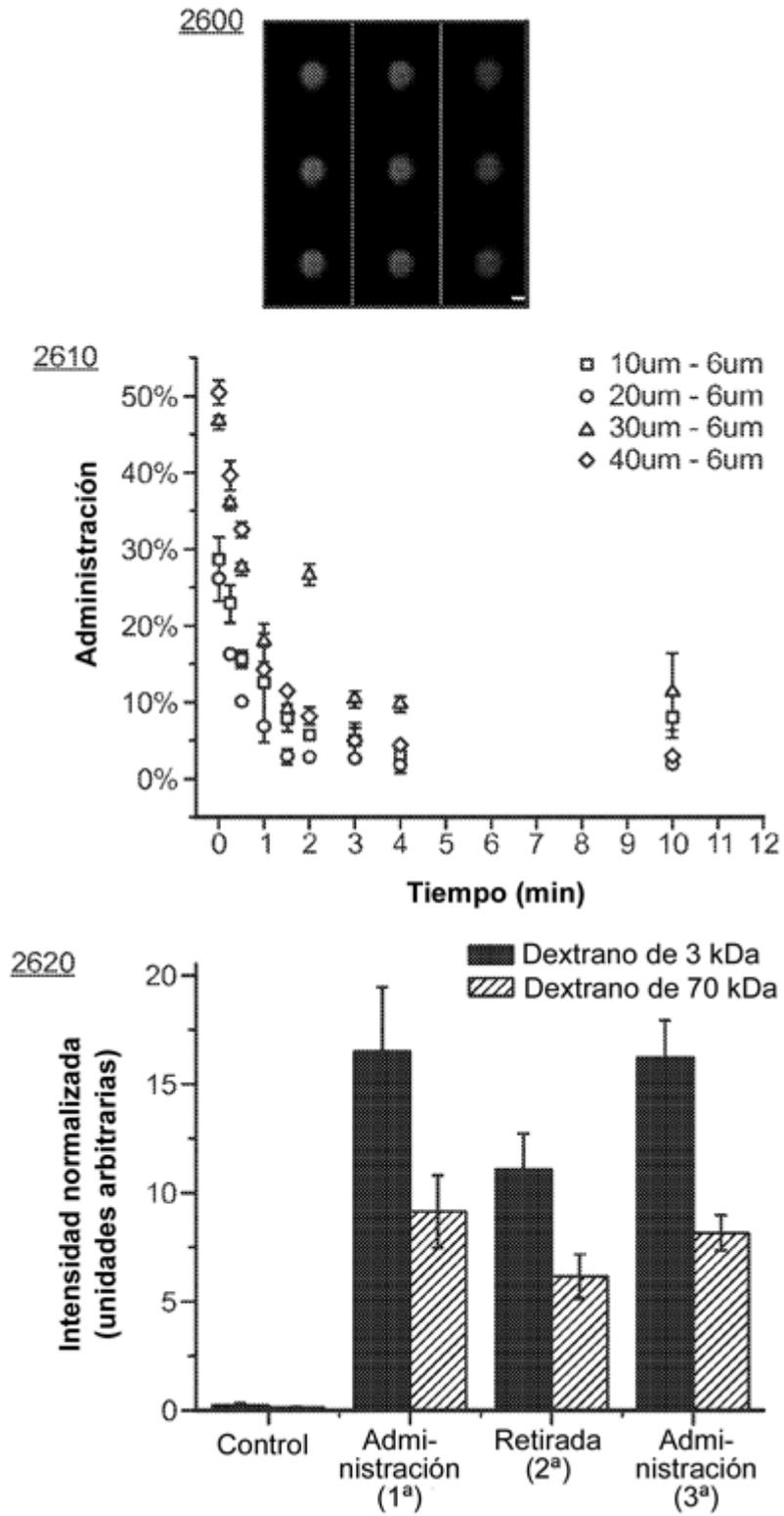


FIG. 26

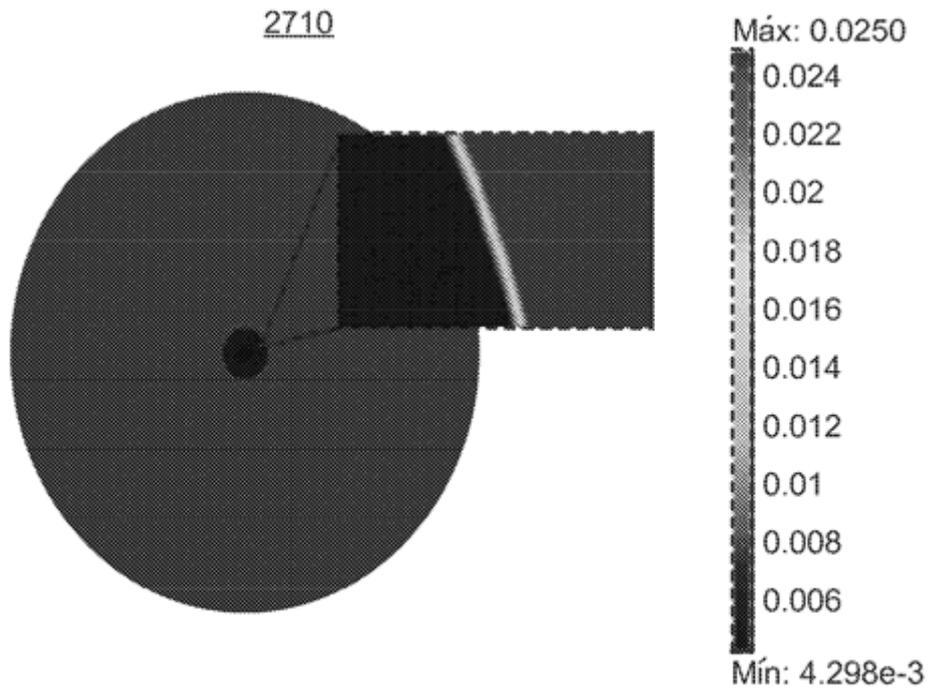
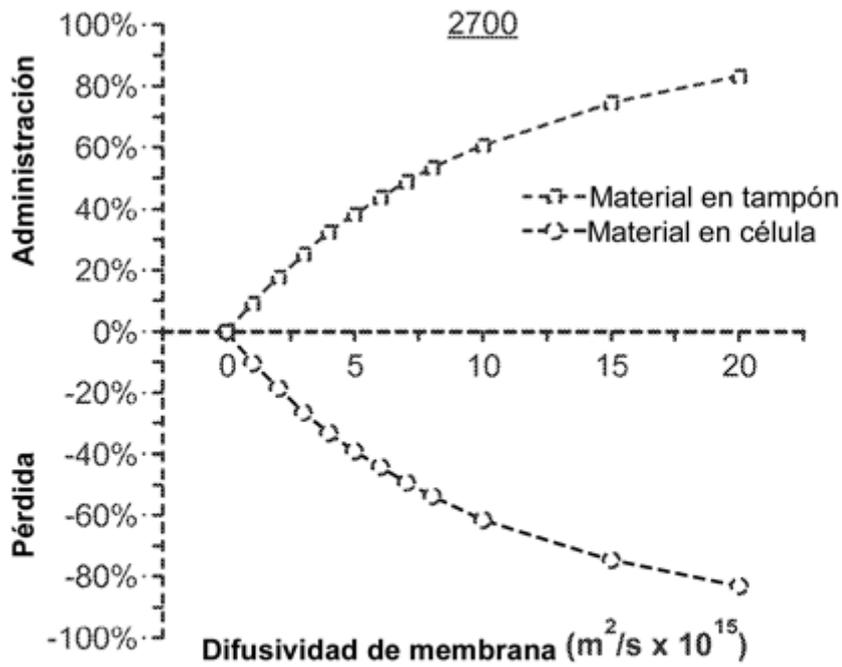


FIG. 27

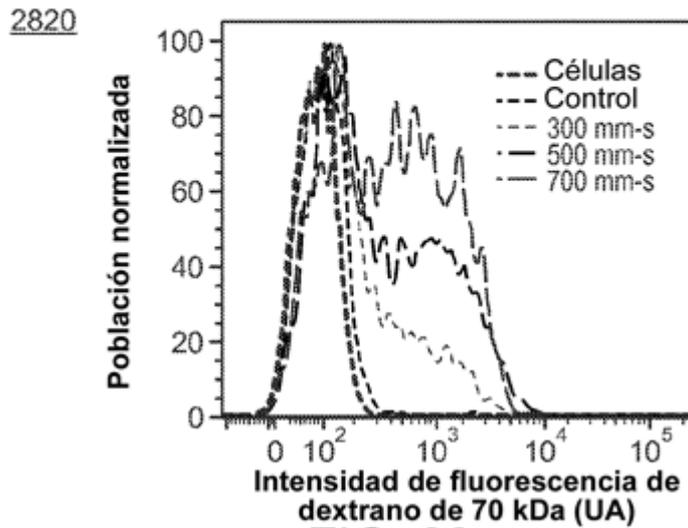
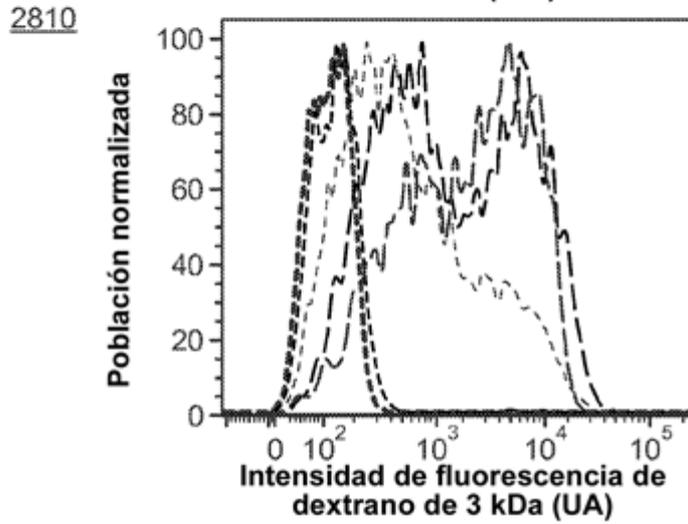
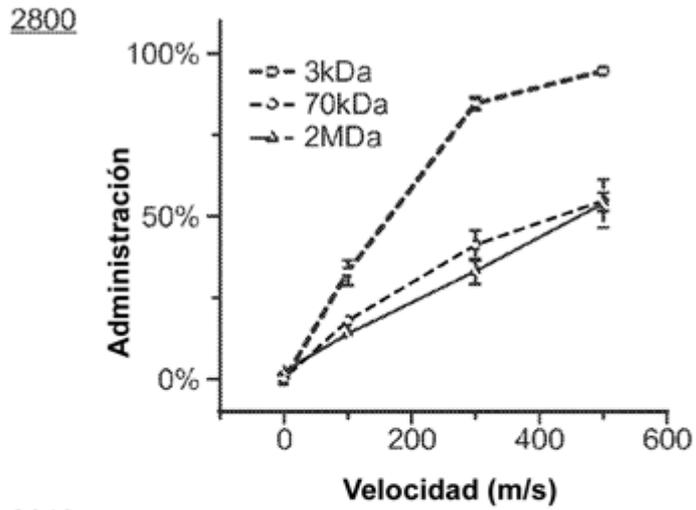


FIG. 28

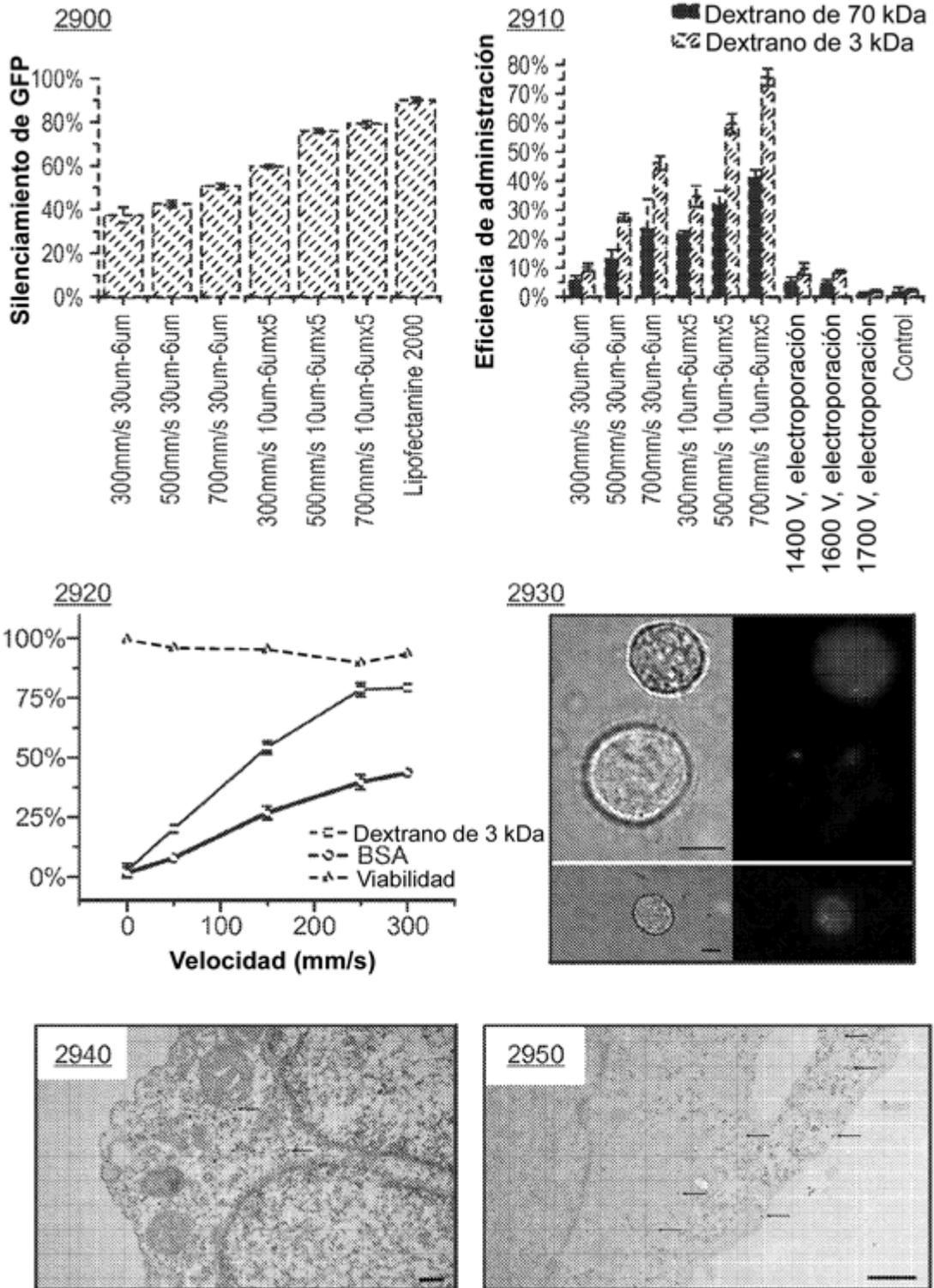


FIG. 29

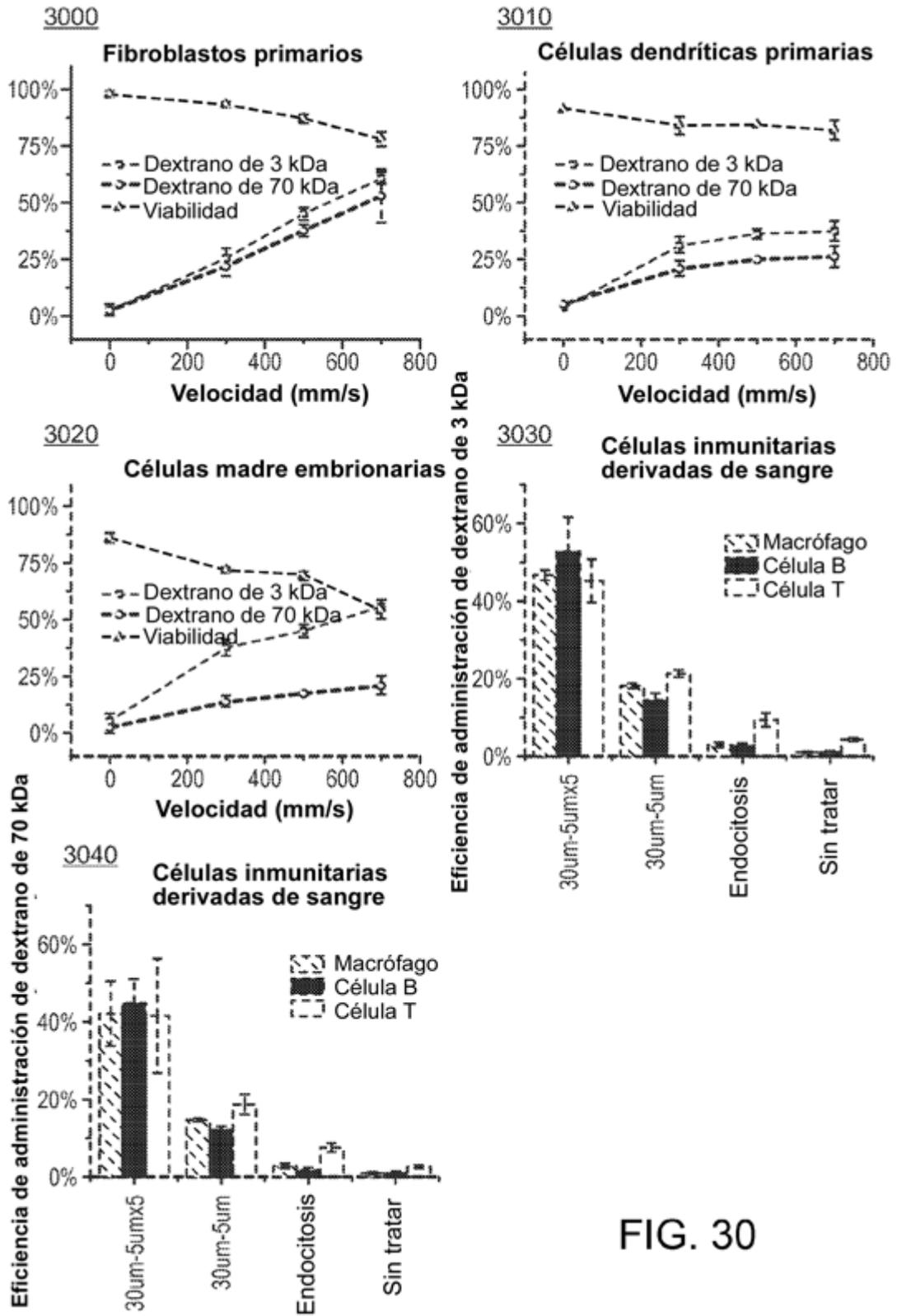


FIG. 30

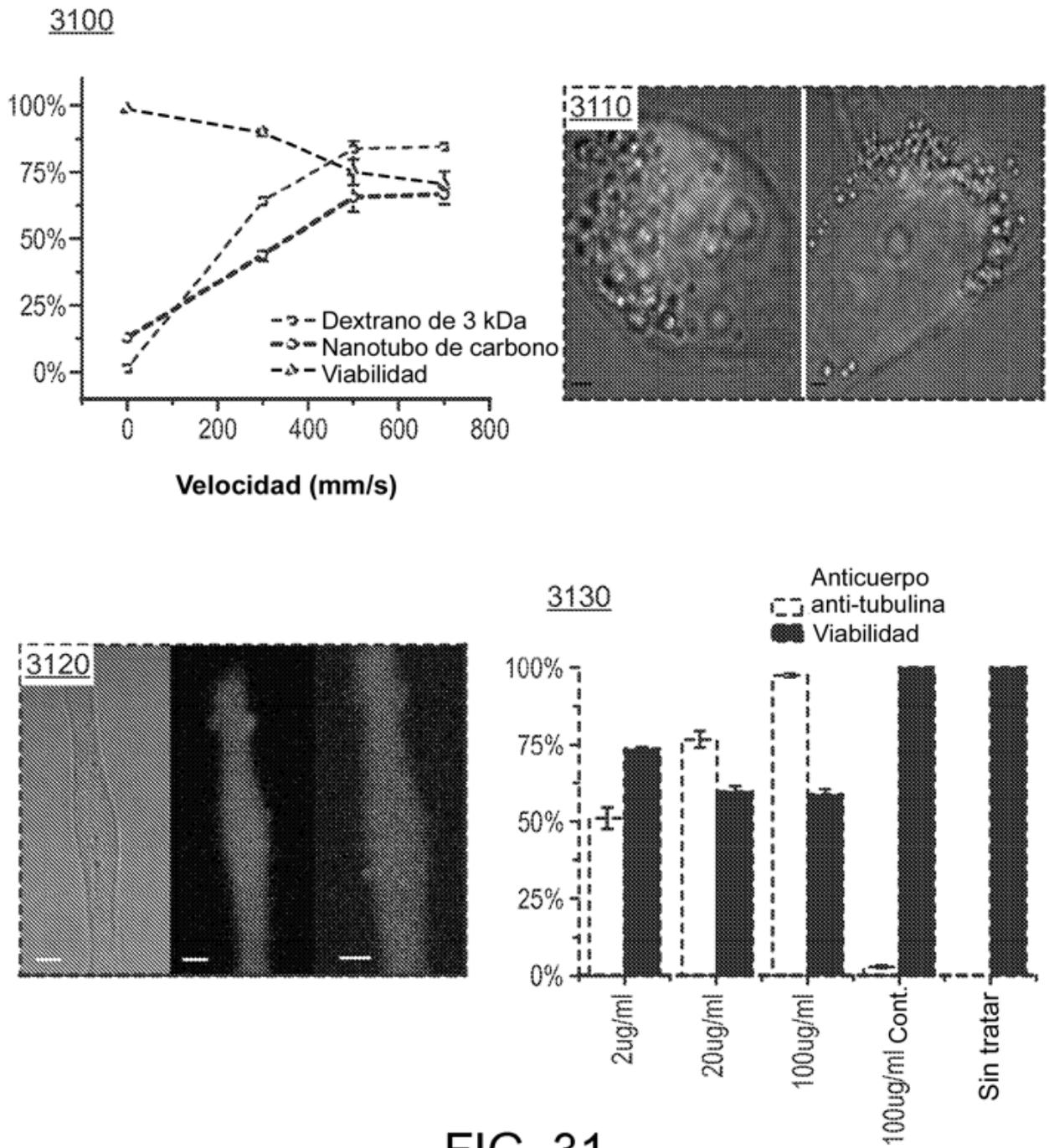
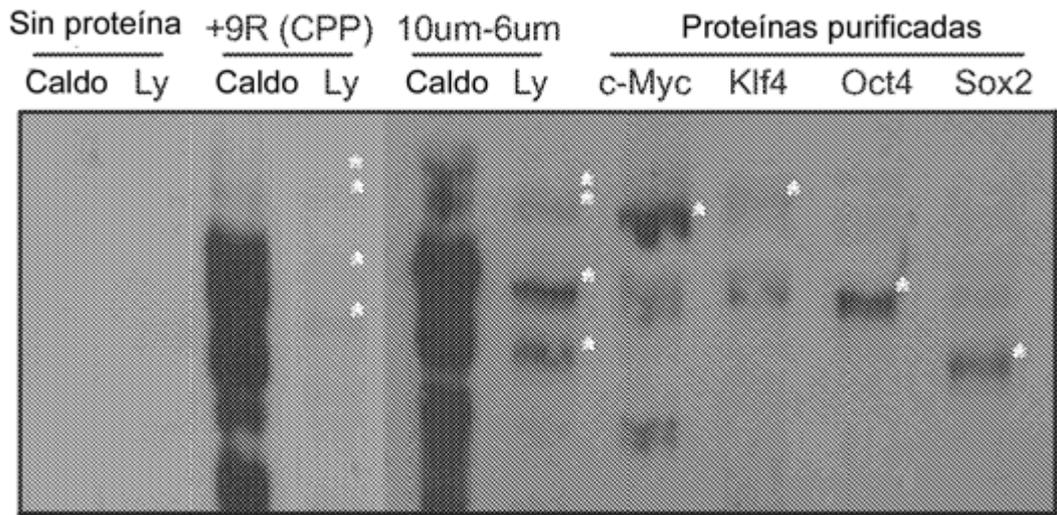


FIG. 31

3200



3210

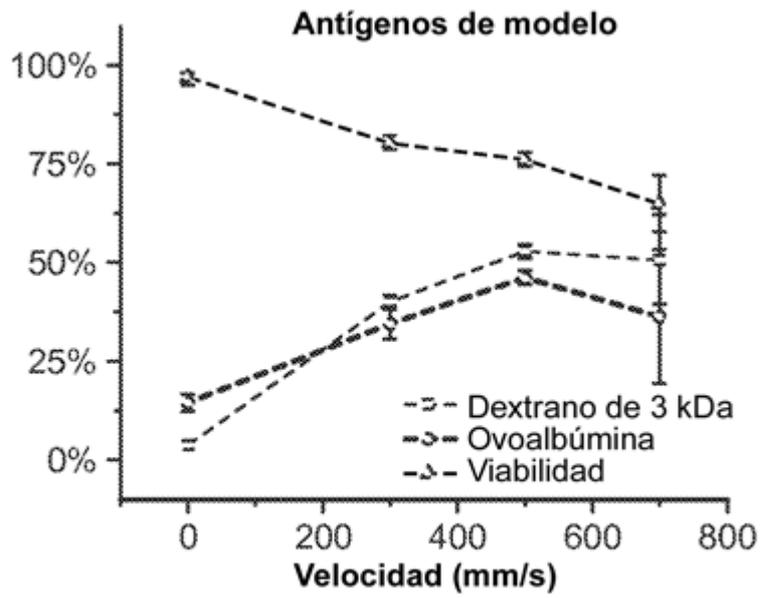


FIG. 32

Tipo de célula	Primaria/ inmortalizada	Administración mediante deformación mecánica rápida
Linfocito B (ratón)	Primaria	Dextrano
DC 2.4 (ratón)	Inmortalizada	Dextrano, proteína
Célula dendrítica (ratón, bazo)	Primaria	Dextrano, proteína
Célula dendrítica (ratón, médula ósea)	Primaria	Dextrano, proteína
Célula madre embrionaria (ratón)	Primaria	Dextrano
Célula madre embrionaria (humana)	Primaria	Dextrano, ARNip
Fibroblastos (humanos, múltiples fuentes)	Primaria	Dextrano, proteína
HeLa (humanas)	Inmortalizada	Dextrano, ARNip, proteína, ADN, nanopartículas, puntos cuánticos, nanotubos de carbono
HT-29 (humanas)	Inmortalizada	Dextrano
Macrófago (ratón)	Primaria	Dextrano
Linfocito T (ratón)	Primaria	Dextrano

FIG. 33

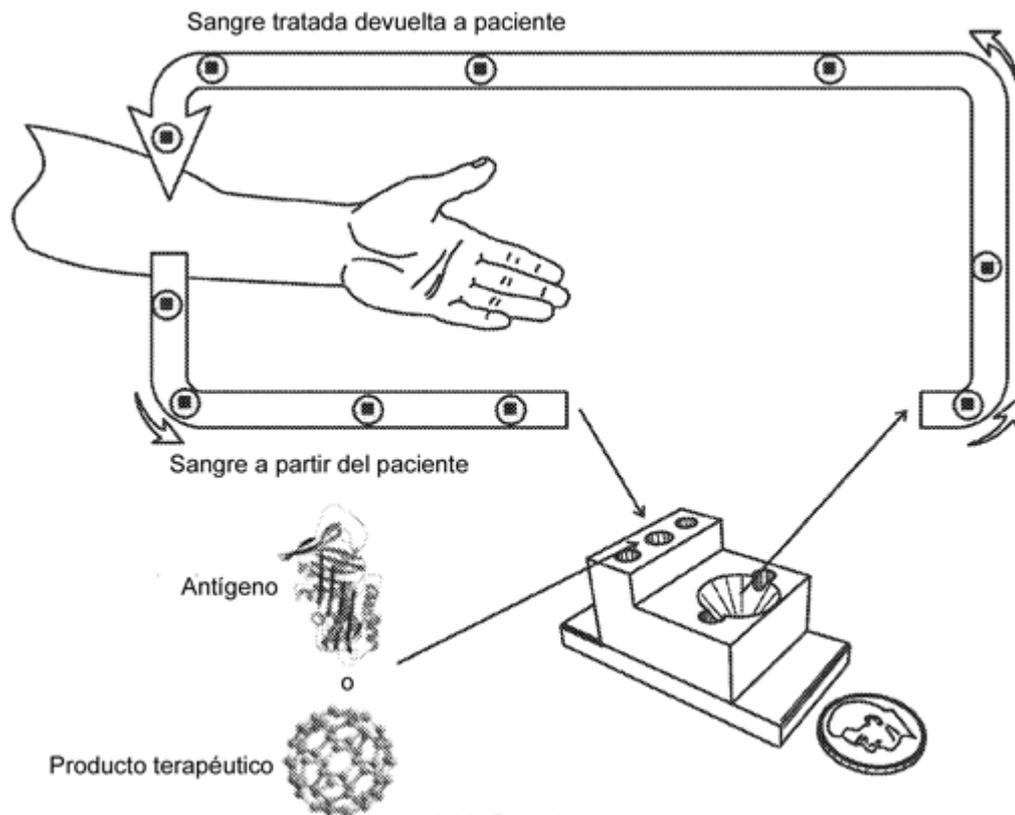
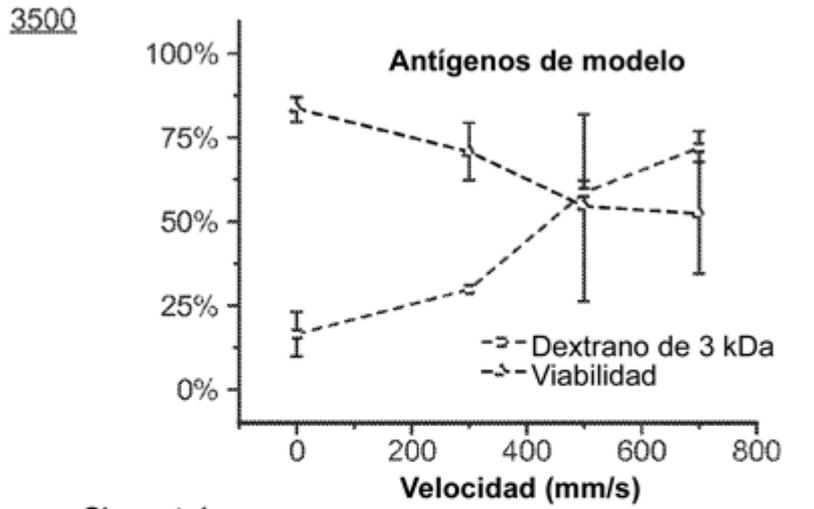


FIG. 34



3510

Sin proteína		+9R (CPP)		10um-6um		Proteínas purificadas			
Caldo	Ly	Caldo	Ly	Caldo	Ly	c-Myc	Klf4	Oct4	Sox2

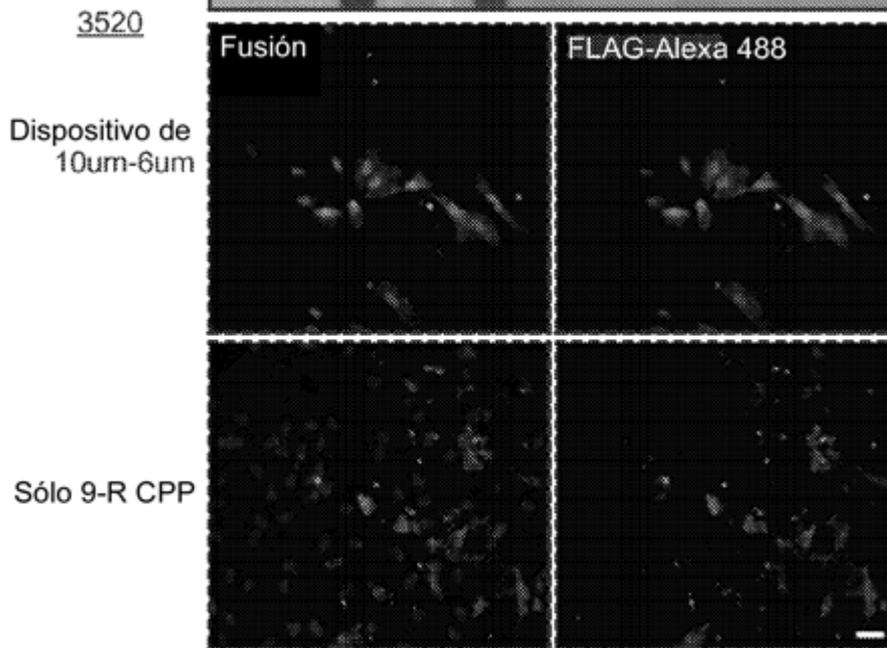
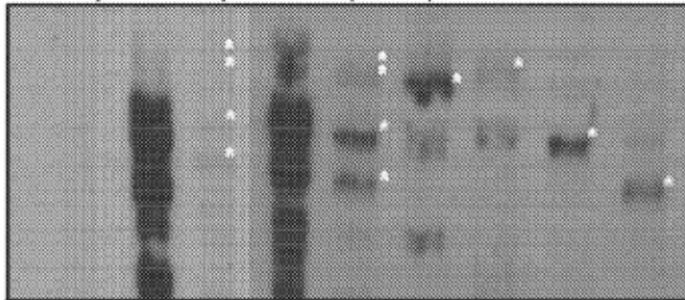
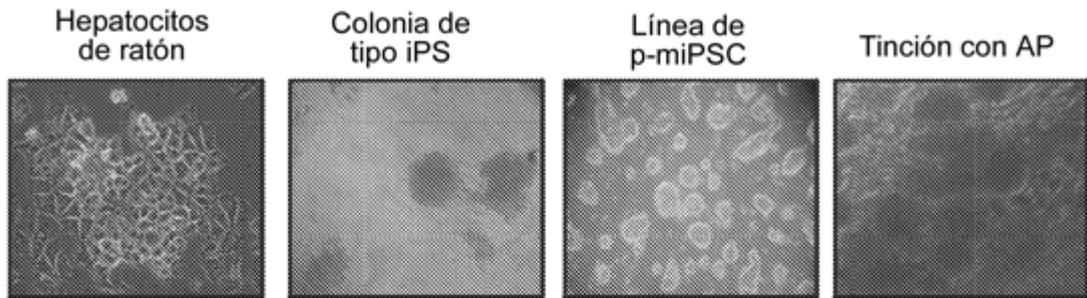
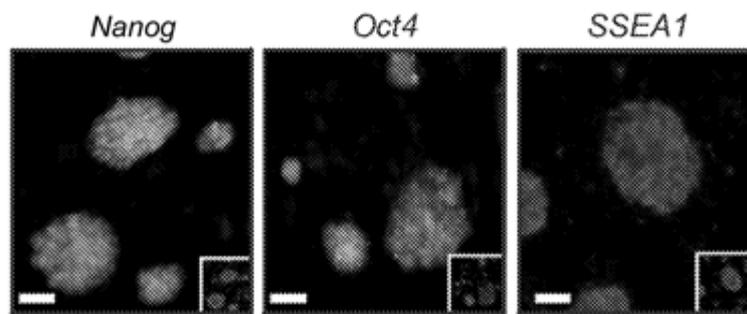


FIG. 35

3600



3610



3620

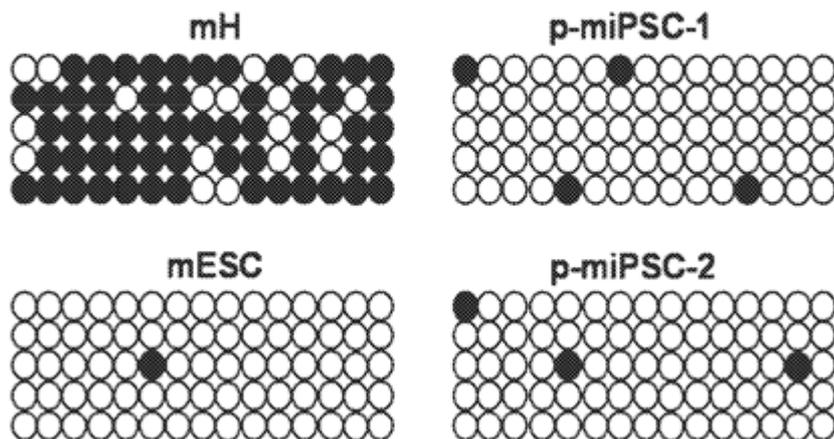


FIG. 36A

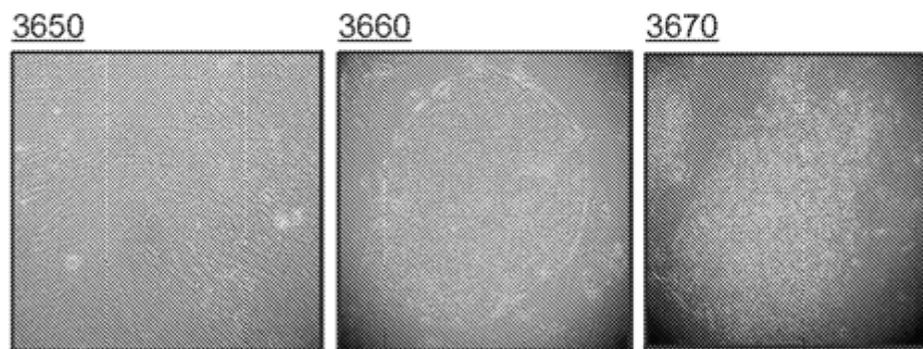
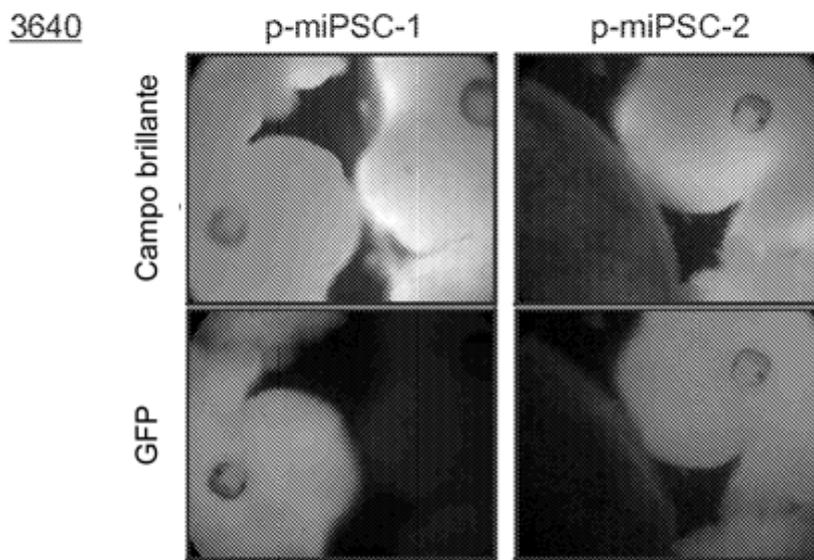
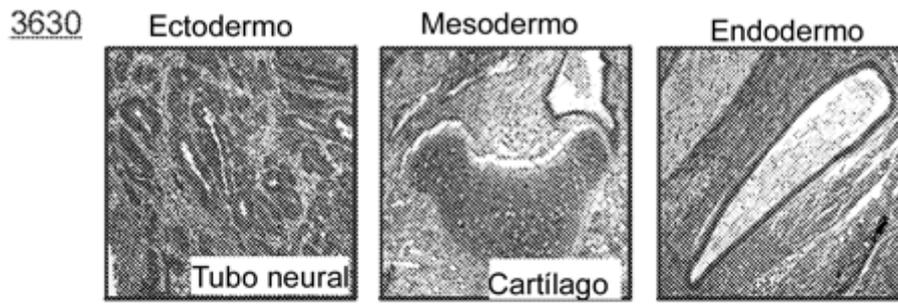


FIG. 36B

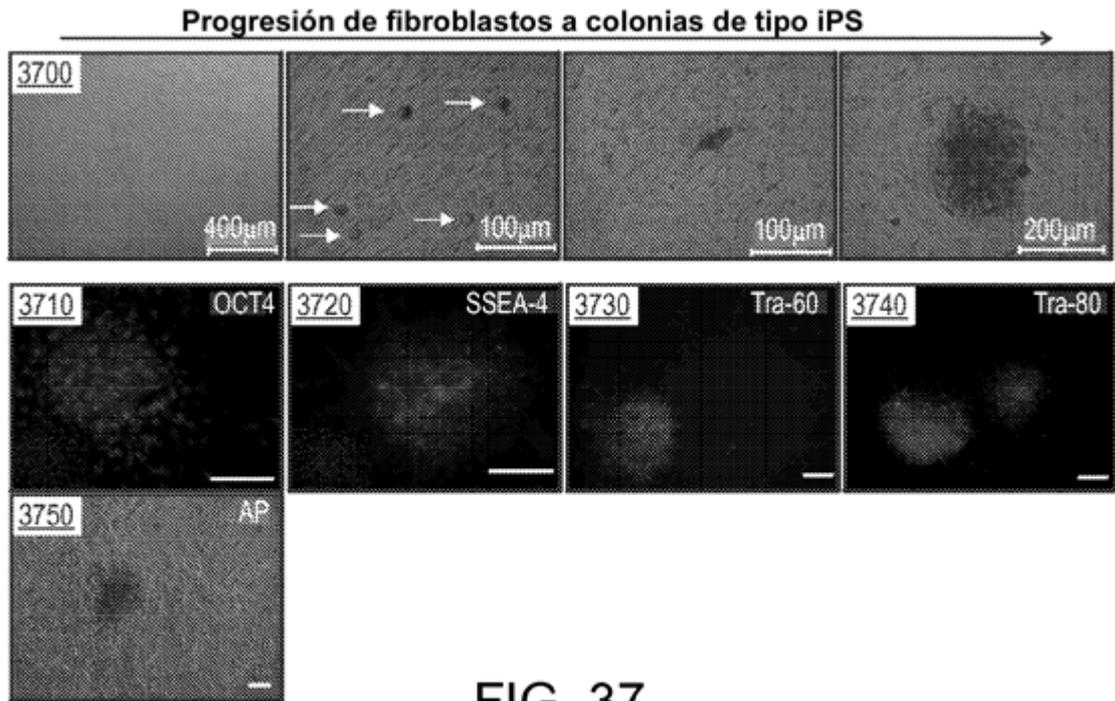


FIG. 37

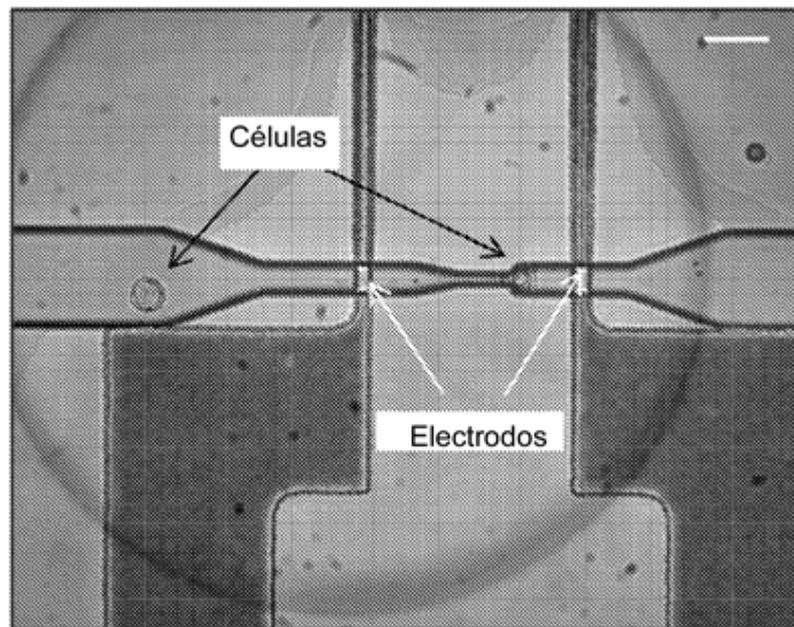


FIG. 38

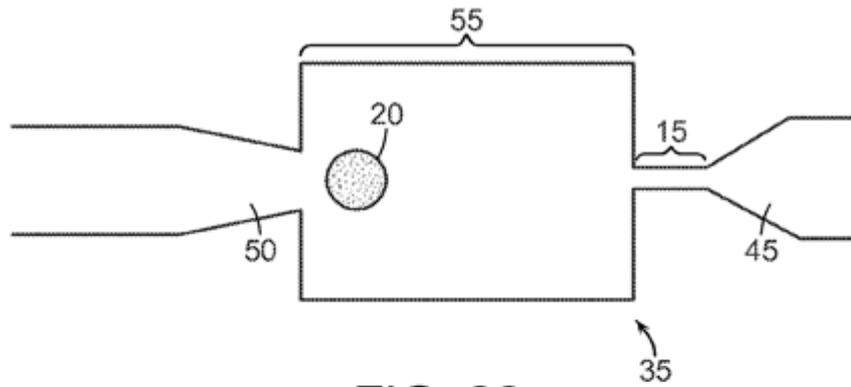


FIG. 39

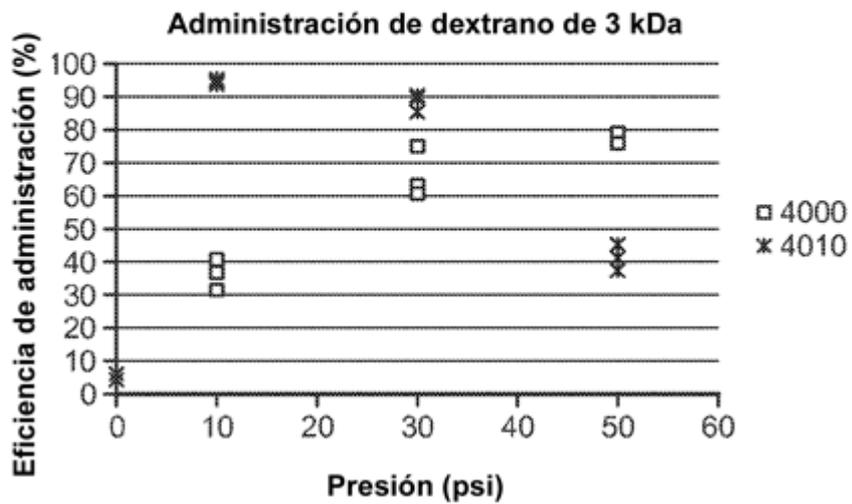
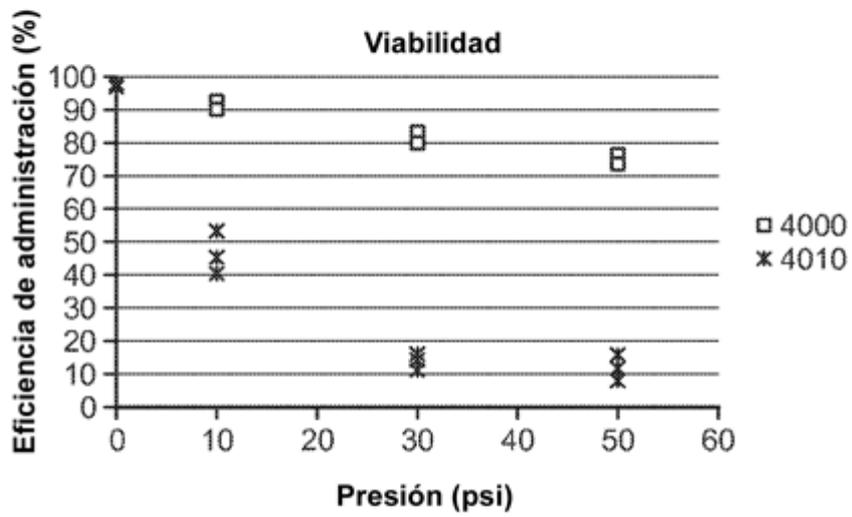


FIG. 40

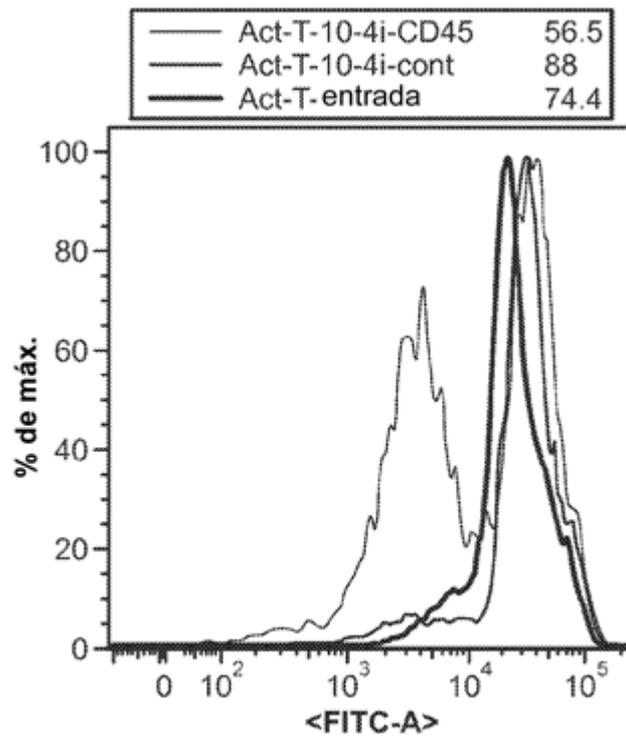
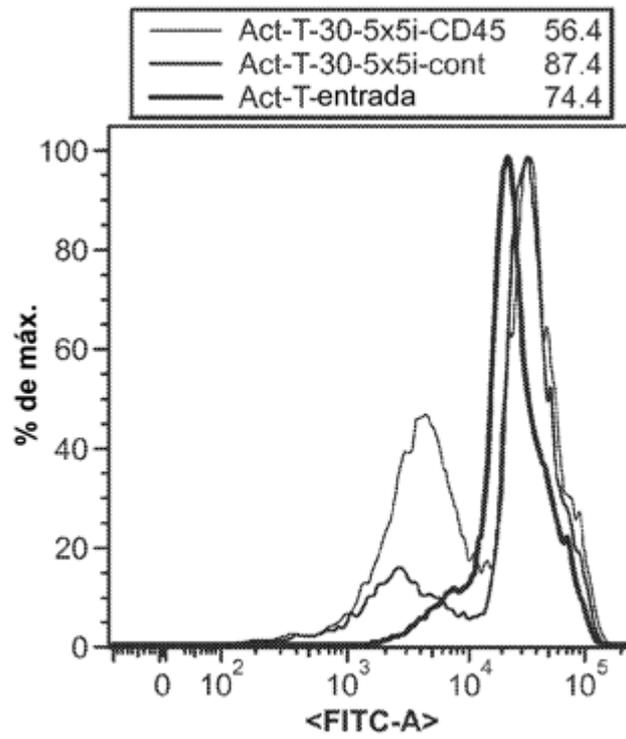


FIG. 41

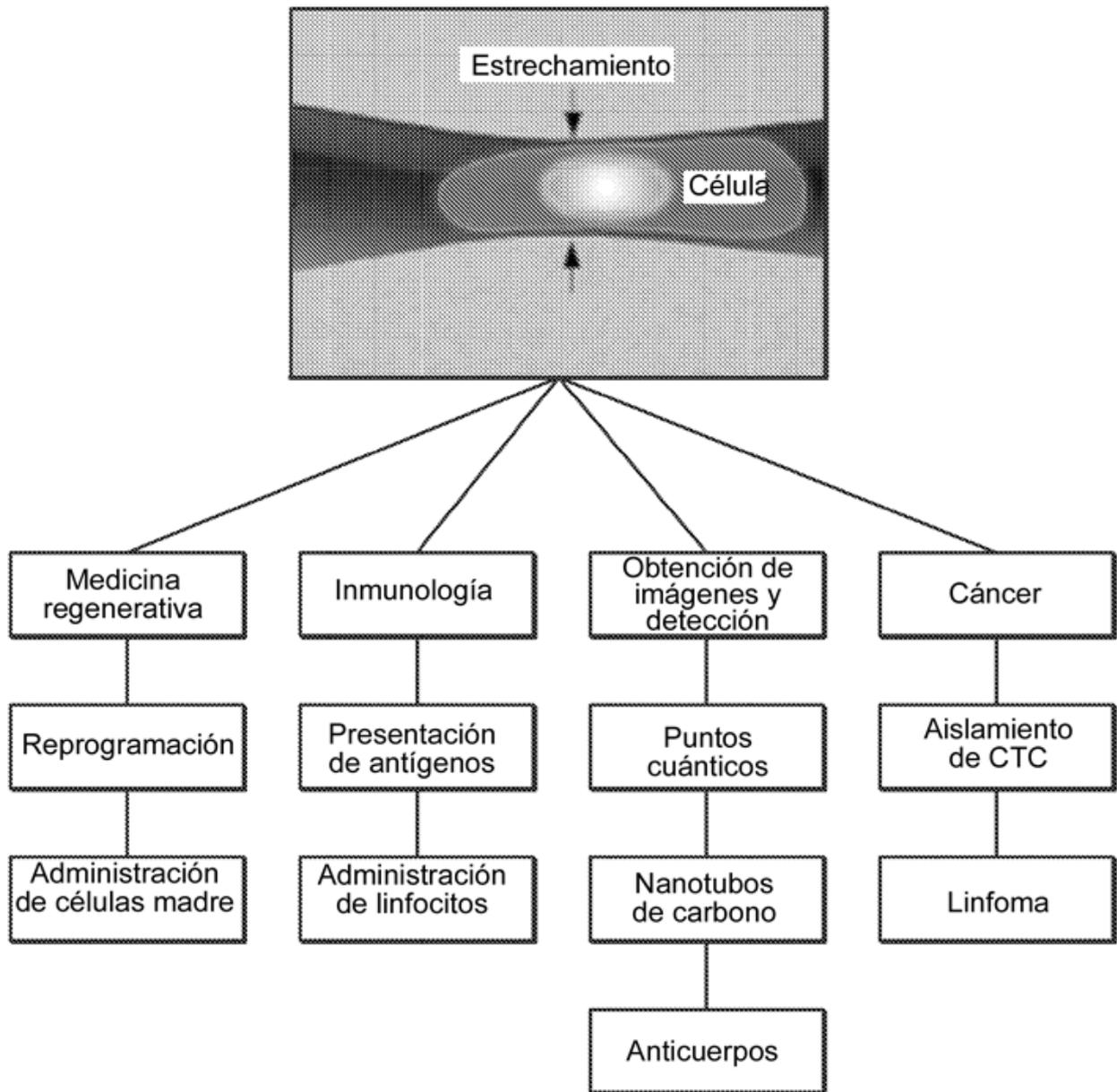


FIG. 42

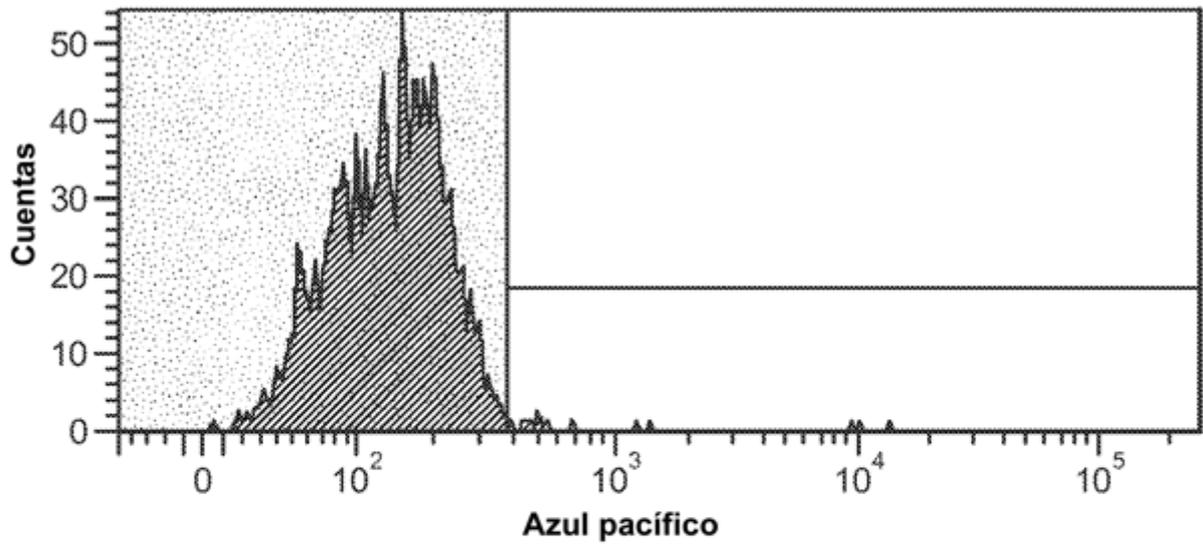


FIG. 43A

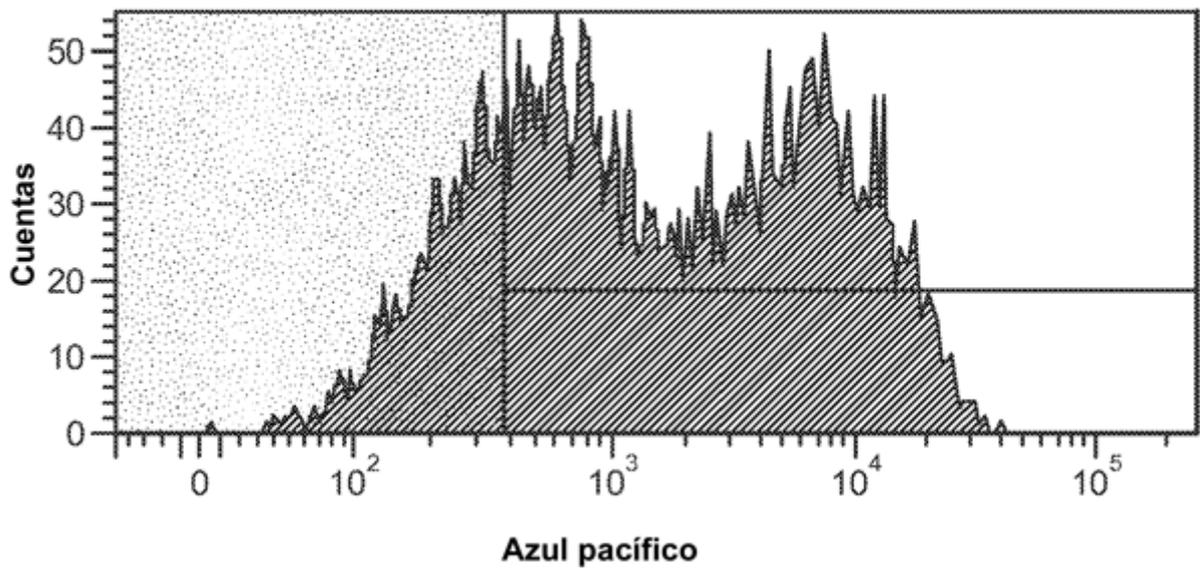
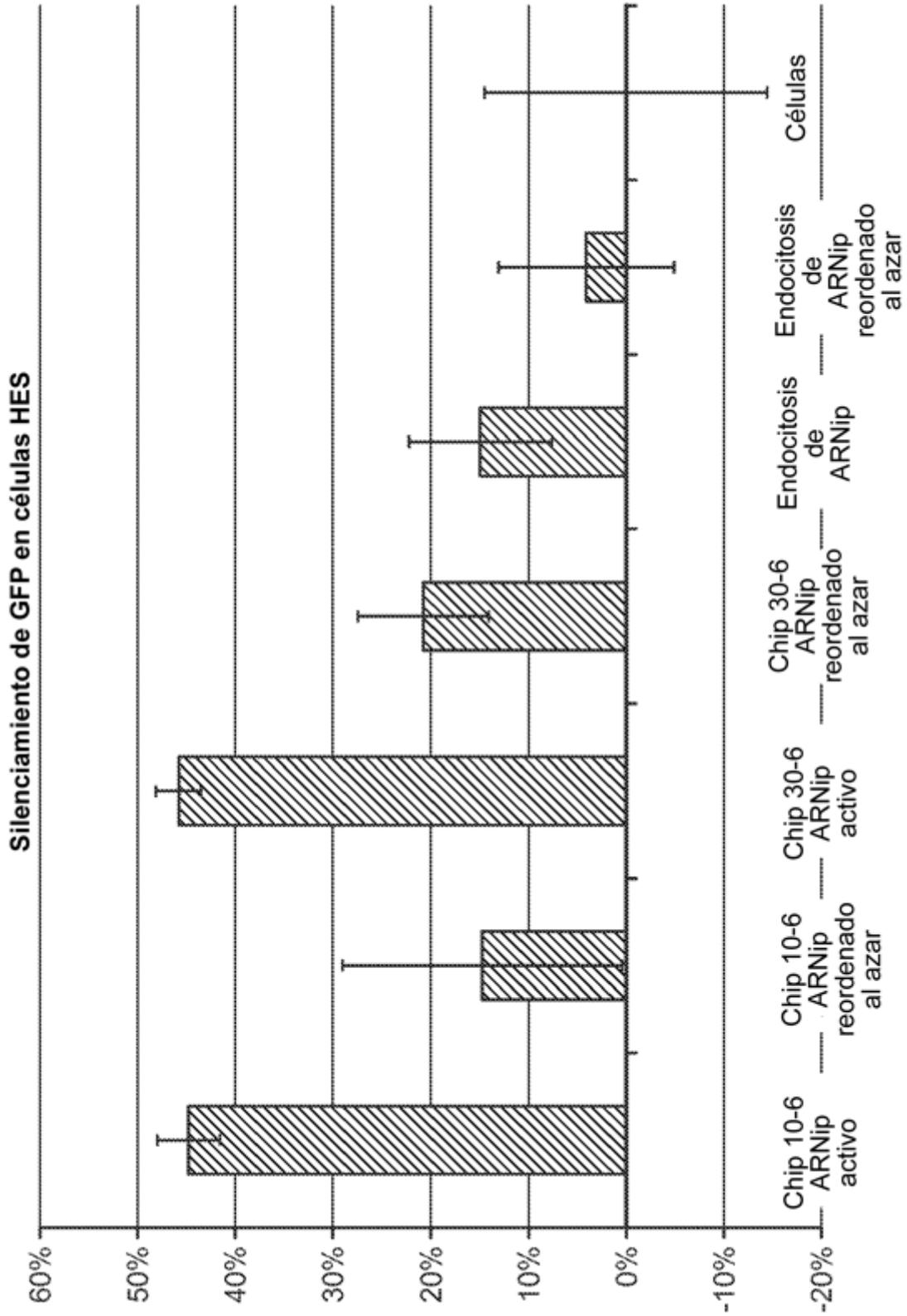


FIG. 43B



**FIG. 44**

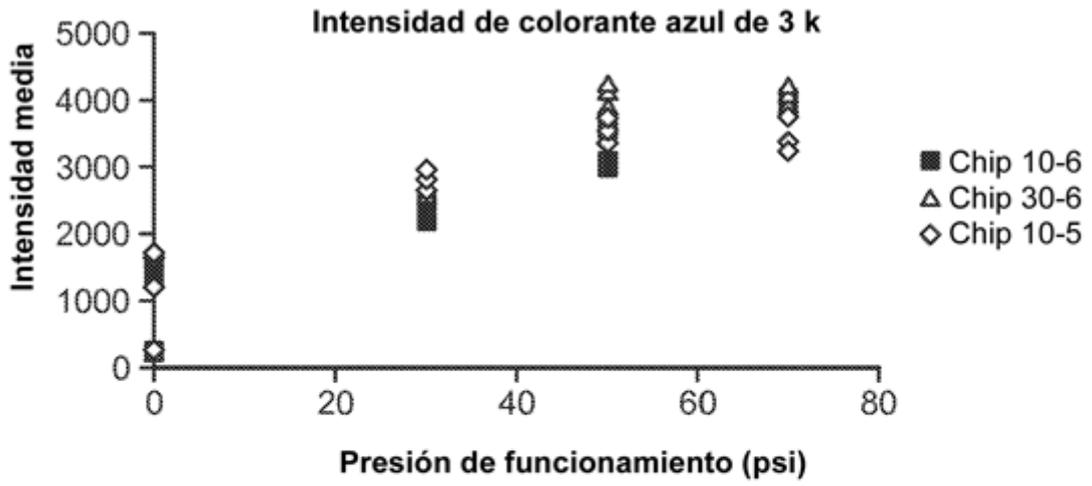


FIG. 45A

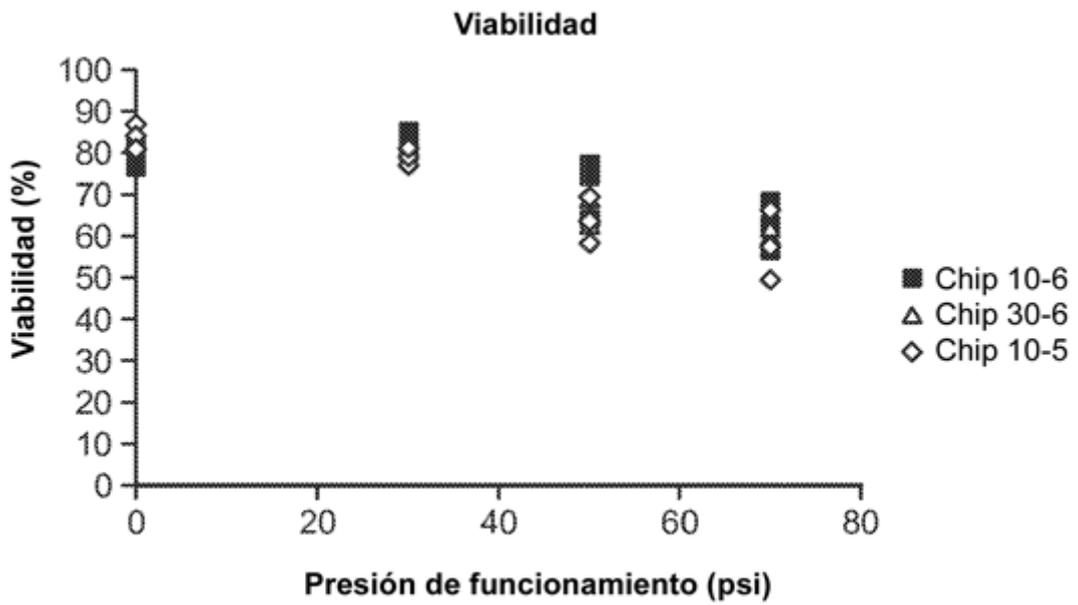


FIG. 45B